

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Bioquímica

**DETECCIÓN Y ANÁLISIS DEL ADN EXTRACELULAR EN
PLASMA DE PACIENTES DE CÁNCER COLORRECTAL:
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL PLASMA DE
TRANSFECTAR Y TRANSFORMAR CÉLULAS EN CULTIVO**

TESIS DOCTORAL

CAROLINA DOMÍNGUEZ BERZOSA

MADRID 2010

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**DETECCIÓN Y ANÁLISIS DEL ADN EXTRACELULAR EN
PLASMA DE PACIENTES DE CÁNCER COLORRECTAL:
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL PLASMA DE
TRANSFECTAR Y TRANSFORMAR CÉLULAS EN CULTIVO**

Tesis presentada para optar al grado de Doctora por la
Universidad Autónoma de Madrid

Carolina Domínguez Berzosa
Licenciada en Ciencias Biológicas

Directores

Dr. Damián García Olmo

Dra. Dolores C. García Olmo

Unidad de Investigación
Hospital Universitario La Paz



DAMIÁN GARCÍA OLMO, Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid,

DOLORES C. GARCÍA OLMO, Profesora asociada del Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Castilla-La Mancha,

CERTIFICAN

Que el trabajo que presenta Doña **CAROLINA DOMÍNGUEZ BERZOSA**, con DNI 2.658.112-W, titulado “Detección y análisis del ADN extracelular en plasma de pacientes de cáncer colorrectal: evaluación de la capacidad del plasma de transfectar y transformar células en cultivo”, ha sido realizado bajo su dirección y consideran que reúne los requisitos de originalidad y rigor metodológico necesarios para ser presentado como Tesis para alcanzar el grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 07 de Junio de 2010

Dr. Damián García Olmo
Profesor Titular de Cirugía

Dra. Dolores C. García Olmo
Profesora Asociada de Ciencias Médicas

Tutor: Dr. Mario Vallejo Fernández de la Reguera
Profesor Honorario Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

A mis padres, a mi hermana y a Juan Pablo.

Intentar significa arriesgar, arriesgar significa probablemente perder, perder significa aprender, aprender significa siempre ganar. Anónimo.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, el Dr. Damián García Olmo y la Dra. Dolores C. García Olmo. Grandes apasionados de su trabajo a los cuales admiro.

Damián, gracias por la oportunidad, por confiar en mí. Por los ánimos constantes y por infundir tanto optimismo, ganas inmensas por descubrir, por aprender, por avanzar y por no rendirse nunca.

Lola, gracias por enseñarme lo que sé. Por la formación técnica, por transmitirme un espíritu crítico, por el rigor científico, por decirme las cosas como son, por la dedicación, por estar siempre ahí cuando te he necesitado, aunque sea en la distancia, y por un largo etcétera. Sin tí no lo habría conseguido. Mil gracias.

A Mariano, por la oportunidad de iniciarme en el mundo científico y guiar mis primeros pasos. Nunca lo voy a olvidar. Por estar siempre para lo que haga falta, por escucharme y ayudarme siempre, por intentar superar los obstáculos que van surgiendo, por “soportarnos” a todos siempre con una sonrisa, por tu buen humor y tu admirable filosofía de vida.

A Paloma, por el recibimiento, por mis primeros geles de agarosa y mis primeras PCRs y por ayudarme en todo lo que necesitaba.

A mis compañeras de la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, en especial a María por tu gran ayuda siempre que he ido a aprender algo nuevo.

A mis tres “mosqueteras” Cris, Marta y Vane, por todos estos años de compartir cosas, sobre todo muchas muchas risas. Ha sido un placer teneros como compañeras y ahora cómo amigas.

A mis compañeros y compañeras del labo, Ainhoa, Lau, Alicia, Cristina, Marisa, Fernando y Pilar. De manera muy especial a Luz, Susana y Nacho. Por vuestra ayuda incondicional sin esperar nada a cambio y por compartir la idea de trabajo en equipo, por la risas y por los momentos “galletas de chocolate”.

A mis compañeros y compañeras de la Unidad de Investigación del Hospital La Paz, por el apoyo y los buenos momentos. De manera especial a Esther, Gemma, Vir, Silvi, Carlos, Ale, Miguel Ángel, Alba, Laura y Merche.

A los chicos cirujanos, en especial a Héctor y a Tiho. Héctor, gracias por tu ayuda cuando hemos tenido que “perseguir” a los pacientes para conseguir las valoradas muestras, y por tu apoyo. Tiho, gracias por ser cómo eres. Vas a llegar muy lejos porque nada se te pone por delante.

A Aran, Estela, Eva y Ceci por los inolvidables años de carrera y porque sé que siempre estaréis ahí.

A mis padres. Mil gracias por ser cómo sois, por cómo me habéis educado, por haberme inculcado unos valores firmes con los que enfrentarme a la vida, por darnoslo

todo y más a mi hermana y a mí, por apoyarme en ésto desde el principio y hasta el final, por ser luchadores, porque habéis dejado muy alto el listón de cómo debe ser una familia, porque os admiro como no admiraré nunca a nadie y porque sois mi ejemplo a seguir. Os quiero.

A mi hermana Laura, por tu fuerza, por no rendirte nunca, por tu amor propio y tu afán de superación, por tu gran corazón, por todo lo que compartimos y lo que nos queda. Porque vas a ser una gran científica, aunque creo que ya lo eres. Estoy orgullosa de ser tu hermana. Te quiero.

A mi cuñado Samu, porque siempre estás dispuesto a echar un cable, porque nunca te rindes, por tus inmensas ganas de superarte y de avanzar, y porque eres el cuñado que mejor alicuota los primers del mundo.

A mis tíos Miguel y Nieves y a mis primos Jose, Mari, Álvaro, David y Ester. Por vuestro granito de arena, que para mí ha sido una montaña, para hacer que yo haya llegado a este punto del camino. Vosotros me entendéis. Gracias inmensas.

Y por último gracias a tí Juanpa. Que te voy a decir que no sepas ya. Gracias por tu apoyo constante, por estar siempre a mi lado, por levantarme cuando me he caído, por aguantarme, por sufrir conmigo, por reír conmigo, por los ánimos, por hacerme ver que todo tiene solución, por tu manera infinitamente positiva de ver las cosas. Me siento tremendamente afortunada de que estés a mi lado. Te quiero mucho.

RESUMEN

En determinados tipos de cáncer, como el colorrectal (CCR), la mortalidad es debida al desarrollo de metástasis, y no al tumor primario. Sin embargo, el proceso de progresión y diseminación tumoral es aún una cuestión sin esclarecer, habiéndose postulado muy diversas teorías que tratan de explicarlo.

La detección de ADN circulante en el plasma de los pacientes de cáncer, ha suscitado un gran interés en la comunidad científica, ya que abre nuevas posibilidades para facilitar el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad. Es un hecho demostrado que ácidos nucleicos extracelulares circulan en sangre, aunque aún no se ha podido establecer con precisión cuál es su origen, el mecanismo de liberación, y su implicación en la fisiopatología de esta enfermedad.

En el presente estudio hemos puesto a punto de una técnica de PCR en tiempo real que permite la detección de mutaciones puntuales en el codón 12 del exón 1 del oncogén *K-ras* humano. Por otro lado, hemos querido evaluar la capacidad transfectante del plasma humano sobre células en cultivo, y determinar si el plasma de pacientes con CCR tiene actividad biológica capaz de provocar una transformación oncogénica de las células.

Para ello, realizamos cultivos de células NIH-3T3 (fibroblastos de ratón inmortalizados) y hASCs (del inglés, “human Adipose Stem Cells”) con el plasma de pacientes y de voluntarios sanos. Aplicamos dos protocolos: contacto directo entre plasma y células, y contacto a través de membranas con poro de 0,4 micras. Posteriormente, estas células fueron inoculadas en ratones inmunodeficientes NOD-SCID.

Las células NIH-3T3 cultivadas con los plasmas de pacientes incorporaron secuencias mutadas y no mutadas del oncogén *K-ras* humano, así como otras secuencias humanas no relacionadas directamente con el proceso canceroso (p53 y β -globina). Al inocularlas en los ratones NOD-SCID dieron lugar a tumores, que tras un estudio histopatológico se identificaron como carcinomas indiferenciados. Por el contrario, en las células hASCs la detección de ADN tumoral fue negativa, y cuando se inyectaron en animales inmunodeficientes no dieron lugar a tumores.

El presente trabajo demuestra, por primera vez, que el plasma de pacientes con CCR tiene capacidad de transfectar y transformar oncogénicamente células NIH-3T3 en cultivo, y que tal efecto no sucede en células madre adultas humanas.

Los resultados obtenidos demuestran la factibilidad de la “Hipótesis de las Genometástasis”, formulada hace una década, según la cual, las metástasis ocurrirían a través la transfección de células susceptibles localizadas en órganos diana a distancia mediante oncogenes dominantes que derivarían del tumor primario, y que circulan en el plasma de los pacientes con cáncer.

SUMMARY

In certain types of cancer, including colorectal cancer (CRC), mortality is due to the development of metastasis, and not to the primary tumor. However, the process of tumor progression and spread is still an unsolved issue, having been postulated many different theories that try to explain it.

The detection of circulating DNA in plasma of cancer patients has attracted considerable interest in the scientific community, since it opens new possibilities to facilitate the diagnosis and prognosis of the disease. It is a proven fact that extracellular nucleic acids circulate in blood, but its origin, as well as the release mechanism and their involvement in the pathophysiology of this disease, have not been precisely established yet.

In this study we have developed a technique of real-time PCR that allows the detection of mutations in codon 12 of exon 1 of human *K-ras* oncogene. On the other hand, we wanted to evaluate the ability of human plasma to transfect cells in culture, and whether the plasma of patients with CRC has biological activity capable of causing oncogenic transformation of cells.

To achieve this goal, we cultured NIH-3T3 cells (immortalized mouse fibroblasts) and hASCs (human Adipose Stem Cells) with the plasma of patients and healthy volunteers. We carried out two protocols: direct contact between plasma and cells, and contact through membranes with pores of 0.4 microns. Subsequently, these cells were inoculated into immunodeficient NOD-SCID mice.

NIH-3T3 cells cultured with plasma of patients incorporated mutated and non-mutated sequences of human *K-ras* oncogene as well as other human sequences not directly related to the cancer process (p53 and β -globin). When inoculated into NOD-SCID mice these cells gave rise to tumors, which after a histopathological study were identified as undifferentiated carcinomas. In contrast, tumoral DNA was not detected in hASCs, which did not lead to tumors when injected into immunodeficient animals.

The present study demonstrates for the first time that the plasma of patients with CRC has the ability to transfect and transform oncogenically NIH-3T3 cells in culture, and this effect does not occur in adult human stem cells.

The results demonstrate the feasibility of "Genometastasis hypothesis", postulated a decade ago, according to which, metastases occur through transfection of susceptible cells located in distant target organs with dominant oncogenes that result from the primary tumor and circulate in the plasma of patients with cancer.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	12
INTRODUCCIÓN	14
1. Aspectos generales de la biología del cáncer.	15
2. Biología molecular del cáncer colorrectal.	18
2.1. CCR y metástasis.....	22
3. ADN circulante en plasma y cáncer.	23
4. Origen y función del ADN circulante en plasma.	26
5. Métodos de detección de ADN circulante en plasma.	28
OBJETIVOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. Muestras humanas.	34
2. Extracción de ADN de muestras biológicas humanas.	34
3. Cuantificación del ADN total de muestras biológicas humanas.	34
4. Detección de mutaciones de K-<i>ras</i> humano.	35
4.1. Detección de mutaciones de K- <i>ras</i> mediante PCR en tiempo real.....	35
4.1.1 Detección en muestras de tumores.	35
4.1.2 Pruebas de sensibilidad.....	36
4.1.3 Detección en muestras de plasmas.	36
4.2. Detección de mutaciones de K- <i>ras</i> mediante secuenciación.....	39
5. Líneas celulares y métodos de cultivo.	40
5.1 Cultivo de células hASCs y NIH-3T3 con ADN libre extraído de tumores de pacientes con CCR.	42
5.2 Cultivo de células hASCs y NIH-3T3 con plasmas de pacientes con CCR.	43
5.3. Cuantificación de ADN mutado por PCR en tiempo real.	45
5.3.1 Análisis estadísticos.....	46
5.4 Cultivo de células hASCs y NIH-3T3 con sobrenadante de cultivos de células SW-480.....	46
5.5 Análisis molecular de cultivos de células hASCs y NIH-3T3.	48
5.5.1 Detección de secuencias mutadas y no mutadas de K- <i>ras</i> humano.	48
5.5.2 Detección de secuencias mutadas y no mutadas de k- <i>ras</i> murino.....	48
5.5.3 Detección de secuencias de p53 humano.	49
5.5.4 Detección de secuencias que codifican la β -globina humana.....	50

6. Ensayo <i>in vivo</i>: inoculación de células hASCs y NIH-3T3 cultivadas con plasmas de pacientes con CCR, en ratones inmunodeficientes.	51
6.1 Detección de secuencias mutadas y no mutadas de K- <i>ras</i> humano en tejidos murinos.	52
6.2 Detección de secuencias mutadas y no mutadas de k- <i>ras</i> murino en tejidos de ratón.	53
7. Esquema general de la parte principal de los experimentos.	53
RESULTADOS	55
1. Resultados de la cuantificación por espectrofotometría en muestras de tumores y plasmas de pacientes con CCR.	56
2. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de K-<i>ras</i> en muestras de tumores colorrectales.	56
2.1. Secuenciación de tumores.	56
2.2. Puesta a punto de la técnica de PCR en tiempo real para la detección de mutaciones de K- <i>ras</i> .	56
2.3. Resultado de las pruebas de sensibilidad del método de PCR en tiempo real para la detección de mutaciones de K- <i>ras</i> .	57
3. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de K-<i>ras</i> en plasmas.	57
4. Cultivo de células hASCs y NIH-3T3 con ADN libre extraído de tumores colorrectales.	58
4.1. Resultados morfológicos: estudio microscópico.	58
4.2. Cuantificación de ADN mutado en las muestras de plasmas y tejidos tumorales.	60
4.3. Análisis molecular de los cultivos.	60
4.3.1. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de K- <i>ras</i> humano.	60
4.3.2. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de k- <i>ras</i> murino.	62
4.3.3. Detección de p53 humano.	63
4.3.4. Detección de β -globina humana.	63
5. Cultivo de células hASCs y NIH-3T3 con plasmas de pacientes con CCR.	63
5.1. Cultivo con plasmas (adición directa).	63
5.1.1. Resultados morfológicos: estudio microscópico.	63
5.1.2. Análisis molecular de los cultivos.	65
5.1.2.1. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de K- <i>ras</i> humano.	65
5.1.2.2. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de k- <i>ras</i> murino.	67
5.1.2.3. Detección de p53 humano.	67
5.1.2.4. Detección de β -globina humana.	68
5.2. Cultivo en placas con membrana (sistema Transwell®).	69
5.2.1. Resultados morfológicos: estudio microscópico.	69
5.2.2. Análisis molecular de los cultivos.	70
5.2.2.1. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de K- <i>ras</i> humano.	70

5.2.2.2. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de k- <i>ras</i> murino.....	71
5.2.2.3. Detección de p53 humano y β -globina humana.	71
6. Cultivo de células hASCs y NIH-3T3 con sobrenadante procedente de células SW-480.....	71
6.1. Resultados morfológicos: estudio microscópico.	71
6.2. Análisis molecular de los cultivos.	73
6.2.1. Detección de secuencias mutadas de K- <i>ras</i> humano.....	73
7. Ensayo <i>in vivo</i>: inoculación de células hASCs y NIH-3T3 cultivadas con plasmas de pacientes con CCR en ratones inmunodeficientes.....	73
7.1. Evolución clínica de los animales.	73
7.2. Estudio histológico de las muestras de tejidos.	74
7.3. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de K- <i>ras</i> humano.	75
7.4. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de k- <i>ras</i> murino.....	79
DISCUSIÓN	80
1. Valor pronóstico y diagnóstico de la detección de secuencias mutadas de K-<i>ras</i> en plasma de pacientes con CCR.	81
2. Utilidad del método descrito para detección de secuencias mutadas de K-<i>ras</i>... ..	82
3. Capacidad transfectante del ADN extraído de tumores.	83
4. Capacidad transfectante del plasma humano.....	84
5. Capacidad transformante del plasma humano.....	87
6. Función/actividad biológica de los CNAPS.....	88
7. Posible implicación de las partículas encontradas en el plasma humano en su capacidad transformante.....	90
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXO	109

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ARG: Arginina.

ASA: Allele Specific Amplification.

CA19-9: Carbohydrate Antigen 19-9.

CCR: Cáncer Colorrectal.

CEA: Carcinoembrionary Antigen.

CIN: Chromosomal Instability.

CNAPS: Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid.

ELISA: Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay.

FAP: Familial Adenomatous Polyposis.

FCS: Fracción Celular Sanguínea.

FISH: Fluorescence In Situ Hybridation.

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer.

hASCs: human Adipose Stem Cells.

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico.

HNPCC: Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer.

MASA: Mutant Allele Specific Amplification.

MEFs: Mouse Embryonic Fibroblasts.

MMR: Mismatch Repair Genes.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

PNA: Peptide Nucleic Acid.

PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism.

PCR-SSCP: Polymerase Chain Reaction Single-Strand Conformation Polymorphism.

PRO: Prolina.

RIA: Radioimmunoassay.

TAE: Tris-acetato-EDTA.

TBE: Tris-borato-EDTA.

TGGE: Temperature Gradient Gel Electrophoresis.

INTRODUCCIÓN

Introducción

1. Aspectos generales de la biología del cáncer.

El cáncer constituye uno de los problemas de salud pública más importantes, siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo. La enfermedad supuso alrededor del 13% de la mortalidad mundial en 2004 (7,4 millones de muertes). El número mundial de muertes por cáncer se prevé que aumente más de un 30% entre 2007 y 2030 (de 7,9 millones a 11,5 millones de muertes), influido en parte por un aumento de la población mundial y el envejecimiento (World Health Organization; www.who.int/cancer/en).

El cáncer es un proceso múltiple y coordinado, caracterizado por el crecimiento celular descontrolado que daña tejidos y órganos (Pecorino, 2008). Existen diferencias entre los denominados tumores benignos y malignos. Un tumor benigno no es evidencia de cáncer. Los tumores benignos no metastatizan, aunque algunos de ellos pueden poner en peligro la vida debido a su localización. Por otro lado, los tumores malignos no suelen permanecer encapsulados, pueden presentar características invasivas y pueden metastatizar (Pecorino, 2008).

Han sido identificados alrededor de 100 tipos de cáncer, y el tejido de origen es el que aporta las características que definen cada proceso tumoral. Existen diferencias en los mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis de cada tipo celular y en el patrón invasivo. Es por ello, que el tratamiento debe ser aplicado de manera diferente dependiendo de estas características.

Se han definido seis características distintivas generales que se dan en la mayoría de los procesos tumorales (Hanahan *et al.*, 2000). Estas son las siguientes:

- Capacidad de autonomía en relación con las señales de crecimiento.
- Evasión de las señales inhibitorias del crecimiento.
- Evasión de la apoptosis.
- Potencial replicativo ilimitado.
- Angiogénesis.
- Invasión y metástasis.

El cáncer surge por mutaciones en genes implicados en la proliferación, diferenciación o muerte celular.

La proliferación celular implica la reproducción de una célula para formar dos células hijas y así sucesivamente. La secuencia de las etapas por las que pasa una célula entre una división celular y la siguiente se denomina **ciclo celular** (Figura 1). El ciclo celular está compuesto por cuatro etapas: G₁, fase S, G₂ y fase M. Las fases G₁, S y G₂ componen el ciclo denominado

interfase. El material genético de la célula se replica en la fase S (síntesis del ADN). La fase M implica la partición de la célula para producir dos células hijas, e incluye mitosis y citocinesis. G_1 y G_2 son los “gaps” o intervalos que preceden las fases S y M durante los cuales la célula se prepara para la siguiente fase. La proliferación celular está regulada por factores moleculares positivos y negativos. Así, para incrementar el crecimiento, se requiere un aumento de los factores positivos o una reducción de los factores negativos.

Existen tres tipos principales de genes, cuyas mutaciones pueden contribuir en los procesos de carcinogénesis: **oncogenes**, **genes supresores de tumores** y **genes reparadores**. Todos ellos juegan un papel principal en alguna de las fases de ciclo celular (Figura 1). Los oncogenes proceden de proto-oncogenes que sufren mutaciones. Estos últimos desempeñan papeles funcionales en las células normales y cuando mutan, dan lugar a los oncogenes que expresan proteínas, que bien se producen en grandes cantidades, o bien incrementan su actividad, actuando de forma dominante y desencadenando el inicio de un proceso tumoral. Actuarían como aceleradores del crecimiento durante la fase G_1 (Gruber *et al.*, 1999).

Por otro lado, los genes supresores de tumores codifican proteínas que participan en la inhibición del crecimiento celular, por lo que su alteración da lugar a una pérdida de la funcionalidad de la proteína y, por tanto, al crecimiento celular descontrolado. Las alteraciones en los genes supresores de tumores suelen ser recesivas, ya que un único alelo intacto es normalmente suficiente para inhibir el crecimiento, así que los dos alelos del gen deberían estar mutados para que la pérdida de función se aprecie fenotípicamente, aunque existen excepciones (Pecorino, 2008). Intervienen antes de la entrada en la fase S, y es necesaria su activación para favorecer la aparición y el desarrollo del tumor (Carson *et al.*, 2004).

Por último, los genes reparadores actúan en la fase G_2 . Son los responsables de la reparación de los errores en la cadena de ADN producidos durante la replicación, o inducidos por radiaciones o agentes químicos (Boland, 1996).

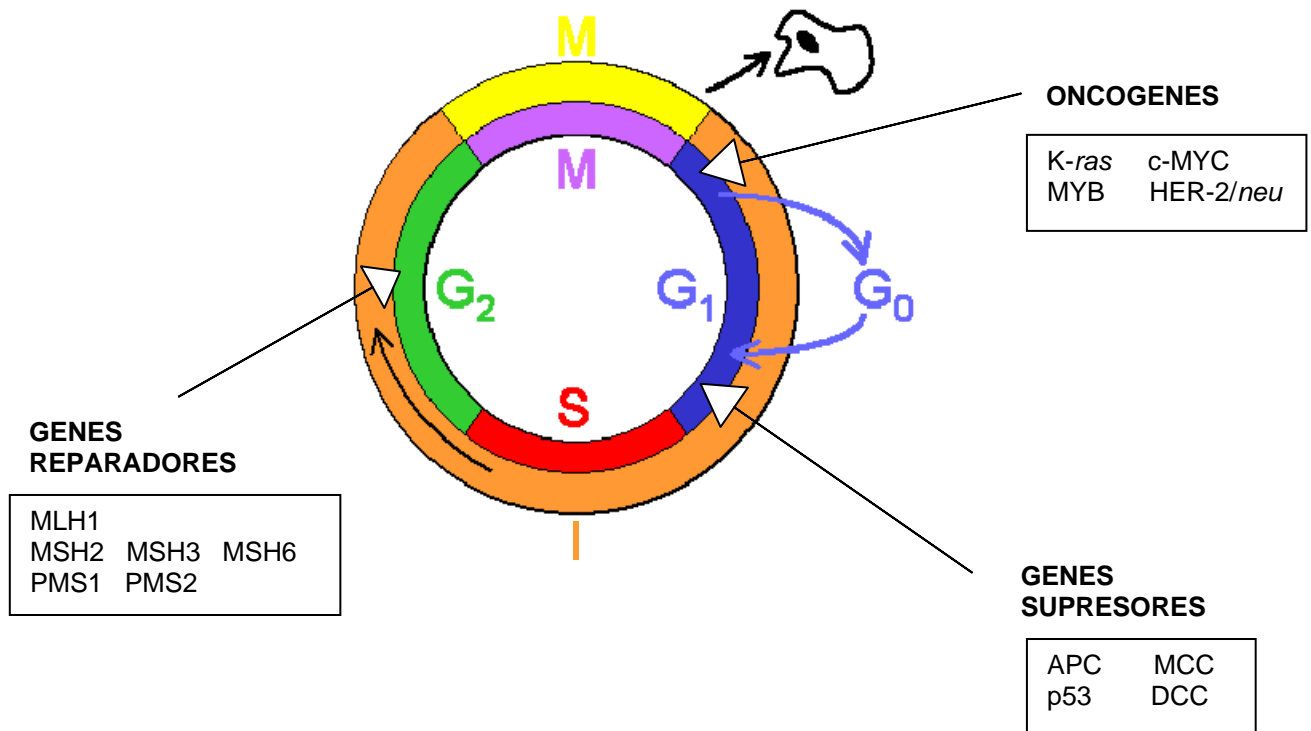


Figura 1. Esquema del ciclo celular y genes implicados, cuya alteración favorece el desarrollo tumoral.

Las metástasis representan el problema clínico principal del cáncer. Se trata de un proceso extraordinariamente complejo hoy por hoy aún no establecido (Hunter *et al.*, 2008). En determinados procesos cancerosos el tumor primario puede ser eliminado quirúrgicamente de forma relativamente sencilla, mientras que cientos de metástasis que se han establecido por todo el cuerpo serían prácticamente imposibles de eliminar (Pecorino, 2008).

La proliferación de las células tumorales tiene como resultado una obstrucción física, competencia con las células normales por los nutrientes y el oxígeno, y la invasión e interferencia con la función del órgano o tejido en cuestión. Es interesante destacar que cánceres específicos metastatizan en sitios específicos. Muchas de las preferencias observadas en la generación de las metástasis en los distintos tejidos y órganos del cuerpo podrían ser explicadas por la direccionalidad del flujo sanguíneo. Sin embargo, alrededor de un tercio de las localizaciones frecuentes de las metástasis son desconcertantes en este aspecto (Pecorino, 2008; García-Olmo *et al.*, 2003).

Una explicación de esta observación ya fue descrita hace más de 100 años en la teoría del “seed and soil” por Paget (Paget, 1889). Esta teoría describía a las células tumorales como “semillas” que requerían entornos óptimos o “suelos” para tener éxito y establecerse.

La habilidad en la producción de las metástasis podría depender de las interacciones de las moléculas de la superficie celular con el microambiente, incluyendo las células vecinas y la matriz extracelular (Pecorino, 2008). Recientes observaciones moleculares sugieren que los

receptores que revisten los capilares en los órganos en los cuales el cáncer se extiende, influyen en el destino de las células metastáticas, y estos descubrimientos apoyarían la teoría del “seed and soil” (Pecorino, 2008).

Serían necesarios muchos más estudios para descubrir los factores necesarios para iniciar el proceso de la metástasis, ya que, a nivel celular, se ha visto que sólo 1 entre 10.000 células tumorales sobrevivirían al transporte hacia el órgano diana donde producirán metástasis (Pecorino, 2008).

2. Biología molecular del cáncer colorrectal.

El cáncer colorrectal (CCR) es la segunda causa más importante de mortalidad asociada a cáncer en Occidente. Causa 639.000 muertes a nivel mundial cada año (World Health Organization; www.who.int/cancer/en). Según las estadísticas de la Sociedad Americana del Cáncer (ACS -*American Cancer Society*-), la incidencia de CCR fue estimada como la tercera en la clasificación de todas las enfermedades malignas para ambos sexos en el año 2008 (Jemal *et al.*, 2008).

Entre los principales oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores implicados en la biología molecular del CCR, se encuentran los siguientes:

a) Oncogenes:

K-ras

Pertenece a una familia implicada en la regulación de procesos de transducción de señales a través de membrana (Barbacid, 1987). Se localiza en el cromosoma 12 y se encuentra mutado en elevada frecuencia en fases tempranas del desarrollo del CCR y se cree que está implicado en la progresión a adenoma intermedio, debido a que solo el 10% de los adenomas tempranos presentan mutaciones en este oncogén, frente a la mitad de los adenomas intermedios y tardíos (Fearon y Vogelstein, 1990; Shibata *et al.*, 1993). La mayoría de las mutaciones de K-ras se localizan en el codón 12 del exón 1, y en menor proporción en los codones 13 y 61 (Tabla 1). Estas mutaciones están asociadas a una hiperactivación de la proteína a la que dan lugar, y a un peor pronóstico clínico (Ahnen *et al.*, 1998; Sidransky *et al.*, 1992).

Mutación	Cambio de base
Gly12Ala	(GGT>GCT)
Gly12Asp	(GGT>GAT)
Gly12Arg	(GGT>CGT)
Gly12Cys	(GGT>TGT)
Gly12Ser	(GGT>AGT)
Gly12Val	(GGT>GTT)
Gly13Asp	(GGC>GAC)

Tabla 1. Principales mutaciones del oncogén K-ras humano.

c-MYC

Se localiza en el cromosoma 8. Pertenece a la familia MYC y codifica una proteína nuclear implicada en la replicación del ADN. En condiciones normales, la proteína de c-MYC acelera el ciclo celular acortando la fase G1. En gran número de cánceres humanos se ha encontrado una sobreexpresión de este gen asociada a tumores poco diferenciados y muy agresivos (Pelengaris y Khan, 2003). Se encuentra sobreexpresado en el 70% de los tumores colorrectales (Arango *et al.*, 2003).

MYB

Codifica un factor de transcripción implicado en la regulación del ciclo celular. Está localizado en el cromosoma 6 y se encuentra sobreexpresado en tumores de colon en más del 80% de los casos (Ramsay y Gonda, 2008).

HER-2/neu

Codifica un receptor tirosina-kinasa transmembranal que funciona como receptor de la herregulina/NDF y de factores de crecimiento de células gliales llamados GGF (*Glial Cell Growth Factors*). Se encuentra localizado en el cromosoma 17 y se ha observado una relación con el estadio tumoral, siendo débil en los estadios A y B de Dukes e intensa en los avanzados (Kapitanovic *et al.*, 1997). Existen datos diversos acerca de la sobreexpresión de este oncogén en cáncer colorrectal, encontrándose en la bibliografía que el rango puede variar entre 0 y 83% (Schuell *et al.*, 2006). Hay autores que han encontrado una sobreexpresión de casi el 50% de los casos analizados (Park *et al.*, 2007).

b) Genes supresores de tumores:

APC (Adenomatous Polyposis Coli)

Identificado como el gen mutado en el síndrome hereditario de la poliposis adenomatosa familiar (FAP; Caspari *et al.*, 1994). Se encuentra localizado en el cromosoma 5. El gen codifica

una proteína implicada en la apoptosis, necesaria para la renovación del epitelio del colon, en funciones de adhesión celular y en procesos de regulación del ciclo celular. Se han descrito numerosas alteraciones de este gen y la gran mayoría de ellas conducen a la formación de una proteína no funcional. La inactivación de un solo alelo del gen APC es suficiente para la aparición de pólipos adenomatosos en el colon, lo que sugiere que puede ser un evento temprano en el desarrollo de los cánceres esporádicos (Vogelstein *et al.*, 1989). En CCR esporádicos y adenomas, incluyendo las lesiones displásicas más pequeñas, se han descrito mutaciones en APC entre el 60-80% de los casos (Fodde y Smits, 2001).

MCC (*Mutated in Colorectal Cancer*)

Se localiza en el cromosoma 5, muy próximo al gen APC. Se encuentra alterado en diversos tipos de cánceres esporádicos de colon (Johnston *et al.*, 1995). Está implicado en la regulación negativa de NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) cuya ruta es importante en la patología del CCR (Bouwmeester *et al.*, 2004). Recientemente se ha observado su función en la inhibición de la vía Wnt a través de la interacción con β -catenina (Fukuyama *et al.*, 2008). Su promotor se encuentra metilado entre el 45 y el 52% de los casos analizados, existiendo evidencias de que esta metilación juega un papel importante en la carcinogénesis colorrectal temprana (Kohonen-Corish *et al.*, 2007).

DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*)

Se localiza en el brazo largo del cromosoma 18. Codifica una proteína con regiones homólogas a las proteínas de adhesión celular. Se piensa que su inactivación contribuye a la invasividad y capacidad metastática de las células tumorales. Se encuentra deletado en el 50% de los adenomas avanzados y en el 70% de los CCR, sin embargo, es poco común en adenomas intermedios y tempranos, por lo que se le ha relacionado con el avance de adenomas intermedios a tardíos (Vogelstein *et al.*, 1989).

p53

Es uno de los genes que más ampliamente se ha estudiado, debido a que se encuentra alterado en aproximadamente un 50% de los tumores humanos y en más del 80% de los tumores colorrectales (Gerdes, 1991). Está localizado en el cromosoma 17. Se cree que está implicado en la transición de adenoma a carcinoma (Vogelstein *et al.*, 1989). La proteína actúa como factor de transcripción de genes implicados en el control del ciclo celular y en apoptosis, asegurando la integridad del genoma celular. Dicha proteína es activada tras producirse un daño en el ADN. La pérdida de función de p53 conlleva una mayor acumulación de mutaciones en otros genes.

nm23 (non metastatic clone 23)

Se encuentra localizado en el cromosoma 17 y la proteína que codifica tiene actividad quinasa. Se encuentra deletado en el 22% de los carcinomas colorrectales invasivos y su pérdida se ha asociado con el aumento en la capacidad metastática de los tumores (Hartsoug y Steeg, 2000).

c) Genes reparadores:

Los genes *mut* (del inglés “*mutator genes*” -genes mutadores-) se describieron por primera vez en bacterias y levaduras (revisado en Boland *et al.*, 1996) constituyendo los genes *mut* HLS. En estos organismos, los genes *mutS* y *mutL* participan en las primeras etapas de la reparación de errores, y su inactivación da como resultado la inestabilidad de microsatélites de forma muy parecida a como se observa en las células tumorales (Papadopoulos *et al.*, 1994). Existen homólogos humanos de estos genes relacionados con la patología tumoral localizados en los cromosomas 2, 3 y 7 (Dunlop, 1996). Estos son:

- Homólogos humanos del gen *mutL*: *hMLH1* (homólogo humano de *mut 1*), *hPMS1* (segregación posmeiótica humano 1) y *hPMS2* (segregación posmeiótica humano 2).
- Homólogos humanos del gen *mutS*: *hMSH2* (homólogo humano de *mut 2*), *hMSH3* (homólogo humano *mut 3*) y *hMSH6* (homólogo humano *mut 6*).

La pérdida de función de estos genes reparadores provoca un incremento significativo de mutaciones en todo el genoma, acelerando el proceso de tumorigénesis, que pueden afectar a oncogenes y genes supresores, estimándose que durante el proceso de replicación la acumulación de mutaciones es del orden de 100 a 1000 veces mayor. En el cáncer de colon hereditario no polipósico, *hMLH1* se encuentra mutado en un 50% de los casos, *hMSH2* en un 40%, *hMSH6* en un 10% y *hPMS2* en menos del 5% (Acharya *et al.*, 1996). En el caso del CCR esporádico, el porcentaje de alteraciones en estos genes es menor, siendo aproximadamente del 15%.

La interacción entre factores genéticos y ambientales tiene un papel importante en la carcinogénesis colorrectal. El pronóstico del CCR, especialmente en el cáncer avanzado, no ha mejorado substancialmente en los últimos años, aunque los mecanismos moleculares implicados han sido mejor comprendidos en las dos últimas décadas en comparación con los mecanismos de otros tumores sólidos, desde que en 1990 Fearon y Vogelstein propusieron un modelo genético de tumorigénesis del CCR (Fearon y Vogelstein, 1990). La progresión de mucosa normal a adenoma y posteriormente a carcinoma, ocurre por la acumulación de mutaciones en genes como *K-ras*, *APC*, *p53* y *DCC*, (Fearon y Vogelstein, 1990; revisado en Li y Lai, 2009; Figura 2).

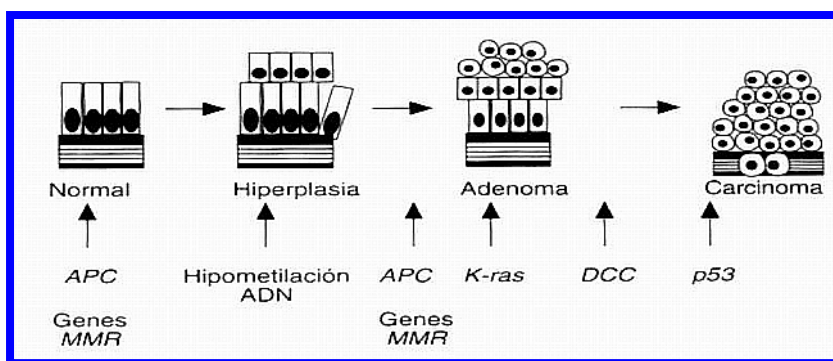


Figura 2. Esquema de la progresión de la secuencia de lesiones que dan lugar a CCR.

En el desarrollo del CCR y existen dos vías tumorigénicas principales. La primera está impulsada por la **inestabilidad cromosómica** (CIN -*Chromosomal Instability*-) en la que estarían implicados oncogenes y genes supresores de tumores. Dentro de estos últimos se encuentran los genes APC, p53 y DCC (Delattre *et al.*, 1989; Fearon y Vogelstein, 1990; Gervaz *et al.*, 2001). Por otro lado, K-ras es el oncogén más común que sigue esta vía. Una de las formas más comunes de CCR que sigue esta vía es la Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP -*Familial Adenomatous Polyposis*-), la cual lleva implicadas alteraciones genéticas en el gen APC (Kinzler *et al.*, 1991; Spirio *et al.*, 1993).

Una vía genética alternativa relacionada con la inestabilidad cromosómica puede ser descrita como consecuencia de la **alteración de los genes de reparadores** (MMR -*Mismatch Repair Genes*-; Gervaz *et al.*, 2001; Miyakura *et al.*, 2001; Thibodeau *et al.*, 1993). Como ya se ha comentado, estos genes son los encargados de la reparación de errores de la replicación del ADN y su alteración da lugar a síndromes bien caracterizados. Cuando la alteración sucede en las células germinales, daría lugar al cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC -*Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*-; Leach *et al.*, 1993, Papadopoulos *et al.*, 1994; Miyaki *et al.*, 1997). Cuando la alteración sucede en células somáticas, daría lugar a un subconjunto de tumores colorrectales esporádicos (Li y Lai., 2009).

2.1. CCR y metástasis.

Las **metástasis** representan el mayor problema clínico de los procesos tumorales (Hunter *et al.*, 2008). El hecho de que los pacientes de cáncer puedan desarrollar metástasis pasados años desde la detección del tumor primario, hace que el proceso metastático sea aún más complicado de definir. Evidencias recientes sugieren que las primeras etapas de las metástasis pueden ser un evento temprano, y que entre el 60 y el 70 % de los pacientes ya han iniciado el proceso metastático en el momento del diagnóstico (Hunter *et al.*, 2008). De hecho, en el CCR parece ser que la mayoría de los rasgos metastáticos se adquieren durante la progresión local desde el tumor primario. La transición desde un estadio a otro (de hiperplasia colorrectal a adenoma, hasta

carcinoma invasivo) se caracteriza por la adquisición de alteraciones genéticas específicas durante periodos prolongados de tiempo, que pueden suponer hasta tres décadas, y algunas de estas alteraciones son requeridas para la formación de metástasis hepáticas a distancia (revisado en Nguyen *et al.*, 2009). Por tanto, parece ser, que los cánceres colorrectales progresan lentamente al estadio de carcinomas invasivos y rápidamente de esta etapa a la fase de metástasis (revisado en Nguyen *et al.*, 2009).

Las metástasis del CCR se producen mayoritariamente en hígado, aunque pueden extenderse a otros órganos como los pulmones (Sadahiro *et al.*, 2004). Se ha descrito que los tumores colorrectales se extienden hacia el hígado predominantemente a lo largo de la circulación mesentérica en el 80% de los pacientes con enfermedad recurrente (revisado en Nguyen *et al.*, 2009). A lo largo de los años han sido desarrolladas muchas hipótesis para intentar explicar la ineficiencia del proceso metastático y su extraordinaria complejidad, pero, hoy por hoy, ninguna de estas teorías explica por completo las observaciones clínicas y biológicas de este fenómeno. Algunos de estos modelos son los siguientes (revisado en Weigelt *et al.*, 2005):

- El modelo tradicional de las metástasis sugiere que sólo algunas subpoblaciones de células tumorales adquieren capacidad metastática tardía en el proceso de tumorigénesis.
- Modelos de metástasis espontánea, que indican que todas las células tumorales tienen la capacidad de desarrollar metástasis.
- El modelo de la “heterogeneidad dinámica”, que propone que la frecuencia con la cual surgen las variantes metastáticas dentro del tumor primario, determina su potencial metastático.
- La teoría del “predominio clonal”, que propone que los subclones de células metastáticas que están dentro del tumor primario, pueden crecer demasiado y dominar la masa tumoral.
- La “hipótesis de las Genometástasis”, que postula que las metástasis ocurrirían por la transfección de células susceptibles de órganos diana a distancia, con oncogenes circulantes.

3. ADN circulante en plasma y cáncer.

En 1948, Mandel y Mètais describieron por primera vez la presencia de ADN y ARN libres en el plasma de 25 individuos, planteando la siguiente pregunta: ¿existe ADN (y ARN) no asociado a células circulando en sangre? (Mandel y Mètais, 1948). Su estudio introdujo la era de los estudios cualitativos del ADN en plasma y suero. Posteriormente, estudios adicionales confirmaron la presencia de ADN libre en sangre de individuos sanos, y particularmente en ciertas enfermedades como lupus eritematoso sistémico (LES; Li y Steinman, 1989; Steinman, 1979) traumatismos (Lo *et al.*, 2000), accidente cerebrovascular agudo (Rainer *et al.*, 2003), enfermedades relacionadas con la Guerra del Golfo (Urnovitz *et al.*, 1999), diabetes mellitus (Swaminathan y Butt, 2006), y cáncer (Leon *et al.*, 1977).

La detección de ácidos nucleicos circulantes en plasma y suero (en terminología anglosajona, *Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum*; CNAPS) en pacientes con cáncer se hizo por primera vez en los años 70 (Leon *et al.*, 1977). Desde entonces son muchos los tipos de cáncer

que han sido estudiados y, en este sentido, el denominador común son los elevados niveles de ADN en plasma o suero que se detectan en pacientes cancerosos, en comparación con individuos sanos.

El estudio de Leon y cols. mostraba que pacientes con cáncer presentaban niveles más elevados de ADN en suero que individuos sin patología tumoral. Se estudiaron 173 pacientes con varios tipos de cáncer y 55 individuos sanos, y encontraron que la concentración de ADN media en los controles sanos era de 13 ng/ml, mientras que la de los pacientes con cáncer ascendía a 180 ng/ml (Leon *et al.*, 1977). Aunque no encontraron una correlación entre los niveles de ADN circulante y el tamaño o localización del tumor primario, sí detectaron niveles significativamente mayores de ADN en suero de pacientes con metástasis, comparados con aquellos que presentaron una enfermedad localizada. Además, los niveles de ADN descendían tras el tratamiento con radioterapia. Por otro lado, la persistencia de elevados niveles de ADN o su incremento, se asoció con una ausencia de respuesta al tratamiento (Leon *et al.*, 1977). Esta conclusión fue confirmada más tarde en un estudio de pacientes con enfermedad gastrointestinal maligna y benigna (Shapiro *et al.*, 1983). Los pacientes con enfermedad benigna tuvieron unos niveles medios de ADN en suero de 118 ng/ml, mientras que en los pacientes con enfermedad maligna fueron de 412 ng/ml.

Por otro lado, se ha sugerido que existe una relación entre la presencia de niveles elevados de ácidos nucleicos circulantes libres en plasma y el desarrollo de metástasis, la respuesta a la terapia y la recidiva de la enfermedad (Chen *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2007).

Estos hallazgos abrieron una puerta al estudio de los fenómenos de la liberación de ácidos nucleicos y su implicación con la progresión de la enfermedad cancerosa, línea que continúa abierta hoy, ya que, trabajos más recientes, muestran resultados similares en el plasma de pacientes con CCR (Boni *et al.*, 2007; Guadalajara *et al.*, 2008), y en otros tipos de cáncer, como el de mama (Zhong *et al.*, 2007).

Por otro lado, se han detectado diversas alteraciones en el ADN circulante de pacientes de diversos tipos de cáncer, por ejemplo, cáncer de próstata (Boddy *et al.*, 2005), pulmón (Gautschi *et al.*, 2004), páncreas (Giacona *et al.*, 1998) o colorrectal (revisado en Fleischhacker, 2007), entre otros. Algunas de estas alteraciones son inestabilidad de microsatélites, metilaciones en el ADN (revisado en Fleischhacker, 2007), o mutaciones en oncogenes específicos (Anker *et al.*, 1999). Estos estudios aportan evidencias de que, al menos parte del ADN detectado en el plasma, deriva del tumor primario.

Uno de los oncogenes más estudiados en el ADN plasmático de pacientes con patología tumoral es *K-ras*, y ello se debe a que posee características que lo hacen de gran utilidad para el estudio de la enfermedad cancerosa. La primera vez que se realizaron análisis mutacionales para detectar *K-ras* en el ADN plasmático de pacientes con cáncer fue en el año 1994, en el trabajo desarrollado por Sorenson y cols. en un grupo de pacientes con carcinoma pancreático (Sorenson *et al.*, 1994).

Entre las razones por las cuales *K-ras* es uno de los oncogenes más estudiados en este contexto, hemos de resaltar las siguientes (revisado en Sorenson, 2000):

- i) Este gen se encuentra frecuentemente mutado en diversos tipos de tumores humanos como los colorrectales, adenoma de páncreas, pulmón y tiroides. También se encuentran mutaciones puntuales de *K-ras*, aunque menos frecuentemente, en tumores testiculares, carcinoma de vesícula biliar, estómago, endometrio y ovario, así como en ciertos tipos de neoplasias hematológicas.
- ii) Las secuencias mutadas de *K-ras*, detectadas en sangre, parecen estar asociadas específicamente con la presencia de tumores.
- iii) Las mutaciones de *K-ras* aparecen mayoritariamente en el codón 12 del exón 1, con lo que el desarrollo de métodos dirigidos a la detección de mutaciones en esta posición es inicialmente sencillo.

Desde el descubrimiento de los CNAPS, y en particular en los últimos años, se ha ido incrementando el interés por el descubrimiento y desarrollo de **biomarcadores moleculares** como herramientas de diagnóstico no invasivo para la detección temprana de los procesos tumorales. Las características mencionadas anteriormente hacen que las secuencias mutadas del oncogén *K-ras* sean, probablemente, las más estudiadas para establecerlas como marcador tumoral en sangre. Existen estudios que comparan la especificidad y sensibilidad de los marcadores habituales que se suelen utilizar en clínica para el diagnóstico de los diversos procesos tumorales, con las diversas alteraciones encontradas en el ADN circulante. En un estudio llevado a cabo por Boni y cols. (Boni *et al.*, 2007), encontraron que, en pacientes con CCR, el antígeno carcinoembrionario (CEA) estaba elevado en un 47% de la población estudiada, mientras que los niveles de ácidos nucleicos plasmáticos estaban elevados en el 100%. Otros estudios sugieren que se pueden identificar secuencias mutadas de *K-ras* en pacientes con bajos niveles del marcador tumoral CA19-9 (Antígeno Carbohidrato 19-9), que normalmente se asocian con este cáncer. Así, la detección de mutaciones de *K-ras* en el plasma de estos pacientes podrían complementar el ensayo de CA19-9, y proporcionar así información clínica de utilidad (revisado en Sorenson, 2000).

Lo ideal para el diagnóstico del cáncer, y sobre todo para los procesos de metástasis, sería disponer de marcadores que indicaran el proceso de la enfermedad en sus primeras etapas, y la detección de las posibles metástasis antes de que se produjeran. De ahí derivan los enormes esfuerzos de muchos investigadores desde hace más de 30 años por buscar estos marcadores tumorales en los CNAPS de pacientes con diversas patologías, y por desarrollar técnicas sensibles y específicas para su detección.

4. Origen y función del ADN circulante en plasma.

Son numerosos los estudios que han centrado sus esfuerzos en el origen de los ácidos nucleicos extracelulares en plasma y suero, particularmente en pacientes de cáncer. Se han sugerido varios mecanismos, aunque aún está por demostrar cuál es la principal vía de liberación de estas moléculas al torrente sanguíneo.

Diversos autores defienden que el posible origen de estos ácidos nucleicos podría ser la rotura de linfocitos **apoptóticos** (Thijssen *et al.*, 2002). Se ha encontrado que en sangre periférica de pacientes con cáncer, existe un incremento en el número de estos linfocitos en comparación con sujetos sanos, lo cual podría explicar la diferencia en los niveles de ADN circulante (Thijssen *et al.*, 2002). La apoptosis en los linfocitos de pacientes con cáncer podría ser causada por la expresión de factores solubles por parte del tumor, tales como Fas ligando, permitiendo así que el tumor evada la respuesta inmune (Shiraki *et al.*, 1997). Otros relacionan este fenómeno con procesos de **necrosis**, de manera que, según el trabajo de Li y cols. (Li *et al.*, 2003), el incremento de ADN libre detectado en el medio de cultivo de células tumorales SK-BR3 (células de adenocarcinoma de mama) coincidiría con procesos de muerte celular. Por otro lado, otros autores han sugerido que la necrosis no es la responsable de la mayoría del ADN encontrado en plasma, ya que sólo una pequeña parte de ese ADN escapa de los procesos de degradación (Lichtenstein *et al.*, 2001). Sin embargo, Jahr y cols. (Jahr *et al.*, 2001) mostraron, tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*, que el ADN soluble en forma de fragmentos de cromatina, era liberado por células necróticas y apoptóticas, y que podrían aparecer eventualmente en el torrente circulatorio. Y, por último, otros autores apuntan a una **liberación activa** de estos ácidos nucleicos por parte de células vivas (Anker *et al.*, 1999; Stroun *et al.*, 1987; Stroun *et al.*, 2000, Stroun *et al.*, 2001), apoyándose en diversas evidencias experimentales como la liberación de fragmentos de ADN de nueva síntesis por linfocitos en cultivo, cuando son estimulados. De manera que, según estos autores, células que no se dividen, liberan espontáneamente, un complejo nucleoproteico con ADN (Stroun *et al.*, 2001). También en 2001, el grupo de Stroun y cols. (Stroun *et al.*, 2001), encontró que la proporción de secuencias repetitivas *Alu* comparadas con secuencias de β -globina, era significativamente mayor tanto en el suero de pacientes con cáncer, como en el de individuos sanos, lo cual apoyaba la teoría de la liberación activa del ADN.

Por lo tanto y en resumen, podría haber dos fuentes principales de liberación de ADN, no necesariamente excluyentes: una fuente “pasiva”, derivada de células que mueren, por fenómenos de necrosis y/o apoptosis o por lisis celular, y una fuente “activa” de liberación, constituida por células vivas que “secretan” estos ácidos nucleicos.

En un artículo reciente, el grupo de Julia Beck y cols. (Beck *et al.*, 2009), describe el perfil del ADN libre circulante en individuos sanos. Mediante la técnica de pirosecuencia, realizaron un estudio de todas las secuencias presentes en el suero de 51 individuos sanos, caracterizando su origen (humano frente a xenogénico), funcionalidad (repeticiones, genes, secuencias codificantes

y no codificantes), y localización cromosómica. Los resultados fueron comparados con controles de ADN genómico mediante el mismo procedimiento. Obtuvieron 450.000 secuencias, de las cuales, un 87% estaban identificadas en bases de datos como secuencias conocidas. De esas secuencias, un 97% eran de ADN genómico y un 3% tenían un origen xenogénico (Beck *et al.*, 2009). Las características respecto a su funcionalidad, no diferían en comparación con las del ADN genómico encontrado y, los ácidos nucleicos circulantes tendían a presentar una elevada proporción de secuencias *Alu*, cómo ya se describió en el año 2001 (Stroun *et al.*, 2001). Curiosamente, se encontraron secuencias que pertenecían al virus de la hepatitis B en uno de los individuos evaluados como sano, sugiriendo de nuevo la adecuación de estos ácidos nucleicos circulantes como biomarcadores de distintas patologías (Beck *et al.*, 2009). Estos resultados sugieren que la liberación inespecífica de ADN no es el único origen de los ácidos nucleicos circulantes.

Existen evidencias experimentales acerca de la posible **función biológica** de los ácidos nucleicos extracelulares. Experimentos *in vitro* muestran que células tumorales pueden liberar espontáneamente partículas que podrían transformar células normales en cultivo (Anker *et al.*, 1994). Más recientemente el grupo liderado por L. Holmgren mostró que partículas apoptóticas podían transferir su contenido genético a otras células (transferencia horizontal), en las que, además, podía expresarse (Holmgren *et al.*, 1999), que esta transfección era estable en el tiempo, y que podría dar lugar a aneuploidías y acumulación de cambios genéticos necesarios para la formación tumoral (Bergsmedh *et al.*, 2001).

En las últimas décadas, el proceso de liberación celular de pequeñas vesículas derivadas de membrana y su papel en la comunicación intercelular, ha adquirido cada vez más importancia. Se han descrito algunas partículas derivadas de células, con tamaños entre 50 y 90 nm de diámetro, que contienen ácidos nucleicos; entre ellas las microvesículas y los exosomas (revisado por Belting *et al.*, 2008). Todos estos estudios están aportando indicios importantes acerca de cómo se transfieren los ácidos nucleicos entre células, y si tienen algún tipo de función biológica en las células que los incorporan (Valadi *et al.*, 2007).

En los últimos años, nuestro grupo ha llevado a cabo diversos estudios encaminados a dilucidar el significado biológico y posible función del ADN circulante en plasma. Así surgió la denominada “Hipótesis de las Genometástasis” (Figura 3), que planteó una posible nueva vía de metastatización, mediante la cual las metástasis se producirían por la transfección de células susceptibles localizadas en órganos diana a distancia mediante oncogenes dominantes derivados del tumor primario, y que circulan en el plasma (García-Olmo *et al.*, 1999, García-Olmo *et al.*, 2000, García-Olmo *et al.*, 2004).

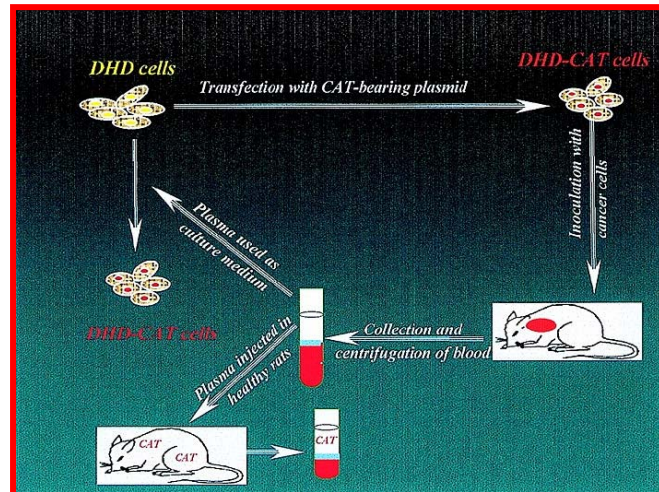


Figura 3. Representación esquemática de la “Hipótesis de las Genometástasis”; García-Olmo et al., 2000.

Esta hipótesis se ha considerado un modelo de metastatización por transferencia génica (Hunter *et al.*, 2008) y ha sido reconocida como un posible mecanismo de transformación tumoral de células a distancia (Weigelt *et al.*, 2005).

Por otro lado, estudios de nuestro grupo muestran que la detección de células tumorales en el torrente sanguíneo es menos frecuente, más tardía que la detección de ácidos nucleicos circulantes, sugiriendo así que estos ácidos nucleicos podrían ser más relevantes en la progresión tumoral que la circulación de células tumorales (García-Olmo *et al.*, 2005).

De estos trabajos se deriva la importancia de seguir profundizando en el estudio de los ácidos nucleicos circulantes, por su posible implicación en el desarrollo de las metástasis, fenómeno del que se siguen desconociendo muchos aspectos.

5. Métodos de detección de ADN circulante en plasma.

Técnicamente, la detección de ácidos nucleicos circulantes libres en plasma se ha realizado de muy diversas formas a lo largo del tiempo. El número de protocolos utilizados para el aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares es probablemente tan numeroso como el número de laboratorios que los utilizan. El principal problema cuando se trabaja con ácidos nucleicos extracelulares es, tanto la baja concentración obtenida, como su pobre calidad, (revisado en Fleischhacker, 2007). La cantidad de ADN que puede ser aislada de plasma o suero es muy baja y esto es, frecuentemente, el factor limitante cuando se quiere realizar un panel de marcadores para la caracterización genética (revisado en Fleischhacker, 2007).

Hay diferentes factores pre-analíticos, como el retraso en el procesamiento de las muestras sanguíneas y la temperatura de conservación, que parecen influir en el rendimiento del ADN obtenido, aunque hay muy pocos datos acerca del efecto que tienen las condiciones de

almacenamiento en las concentraciones de ADN plasmático. El grupo de Sozzi y cols. (Sozzi *et al.*, 2005) estudió el impacto que el almacenamiento prolongado tiene en las concentraciones de ADN extraídas de plasma y congeladas, de pacientes con cáncer de pulmón y controles sanos, y de plasmas congelados previamente a la extracción. Concretamente investigaron si el almacenamiento prolongado de alícuotas de plasma completo o de ADN aislado de plasma afectaba a los resultados de cuantificación, mediante PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) cuantitativa para el gen de la telomerasa humana. El ADN aislado de las alícuotas de plasma se conservó a -20°C, mientras que las alícuotas de plasma completo se conservaron a -80°C hasta la extracción del ADN. Sus resultados mostraron que el almacenamiento prolongado de ADN aislado o plasma completo almacenado antes de la extracción, tenía como consecuencia una degradación substancial del ADN (Sozzi *et al.*, 2005). Esto de especial importancia si se piensa en utilizar los ácidos nucleicos extracelulares como biomarcadores (Sozzi *et al.*, 2005).

Otros autores han comprobado que no hay cambios en la concentración de ADN plasmático en muestras almacenadas a 4°C o a temperatura ambiente durante 24 horas (Jung *et al.*, 2003). Sin embargo, el almacenamiento de la sangre a temperatura ambiente antes de la centrifugación si tuvo un impacto substancial en la concentración de ADN extraído de muestras de suero (Jung *et al.*, 2003).

Por otro lado, un factor crítico a la hora de trabajar con ácidos nucleicos extracelulares, es eliminar de las muestras de partida las posibles células contaminantes, lo cual puede realizarse mediante protocolos de centrifugación (combinando centrifugaciones de baja y alta velocidad) y/o filtración (Chiu *et al.*, 2001; Thijssen *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2003; Swinkels *et al.*, 2003; Holdenrieder *et al.*, 2005;).

Por todo ello, sería necesario optimizar y estandarizar aspectos tales como el método de obtención de sangre, y las condiciones de centrifugación, conservación y tratamiento de la muestra, con el fin de obtener resultados comparables entre los diversos grupos.

Los **métodos** para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos circulantes en plasma han sido y son muy diversos. Estas técnicas incluyen el Radioinmunoensayo (RIA; del inglés *Radioimmunoassay*), ELISA (del inglés *Enzyme Linked ImmunoabSorbent Assay*), PCR competitiva, PCR cuantitativa en tiempo real, y técnicas fluorimétricas y espectrofotométricas entre otras (revisado en Fleischhacker, 2007). En un artículo reciente se describe la detección de ADN tumoral extracelular utilizando una técnica novedosa denominada BEAMing (del inglés *Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics*), basada en la cuantificación de ADN tumoral circulante utilizando bolas magnéticas (Fleischhacker y Schmidt, 2008). Por otro lado, la búsqueda de ADN exclusivamente tumoral requiere aún de técnicas más complejas ya que se ha de trabajar sobre un sustrato constituido fundamentalmente por ADN no tumoral. Así, por ejemplo, la detección de mutaciones puntuales, propias de una gran variedad de tumores, requiere de cierta complejidad técnica que asegure una sensibilidad y especificidad adecuadas. Algunos autores han realizado estudios de detección de mutaciones del oncogén K-*ras* en

diversos tipos de patologías tumorales utilizando oligómeros ácido péptido nucleicos (en terminología anglosajona, *Peptide Nucleic Acid*, PNA) y sondas fluorescentes de hibridación (Lahr *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004; Däbritz *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2006; García-Olmo *et al.*, 2008) pero normalmente son necesarias modificaciones de la técnica para poder adaptarla al tipo de muestra que se pretende analizar, y la mutación que se trata de detectar.

Otros métodos que han sido y son utilizados para la detección de mutaciones presentes en los ácidos nucleicos circulantes sanguíneos son las técnicas MASA (del inglés *Mutant Allele Specific Amplification*), ASA (del inglés *Allele Specific Amplification*), PCR “enriquecida”, PCR-SSCP (del inglés *Polymerase Chain Reaction Single-Strand Conformation Polymorphism*), TGGE (del inglés *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*), y PCR-RFLP (del inglés *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), entre otras (revisado en Fleischhacker, 2007).

OBJETIVOS

Objetivos

Objetivo principal

Determinar si el plasma de pacientes de CCR tiene actividad biológica suficiente para provocar una transformación oncogénica de células en cultivo.

Objetivos secundarios

1. Evaluar la capacidad transfectante del plasma humano sobre células en cultivo.
2. Poner a punto una técnica de PCR en tiempo real para la detección de mutaciones puntuales en el codón 12 del exón 1 del gen *K-ras*, en muestras de tumores primarios y plasmas de pacientes de CCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Métodos

1. Muestras humanas.

Se utilizaron muestras de tumores primarios y de sangre de pacientes con CCR (Figuras 9 y 10) tratados en el Hospital Universitario “La Paz” (Madrid, España). El procedimiento fue previamente aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de dicho Centro, y las muestras del estudio se obtuvieron previo consentimiento informado de los pacientes.

La recogida de muestras sanguíneas fue pre-operatoria en 5 tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), a razón de 3 ml por tubo. Por tanto, el volumen de partida de las muestras sanguíneas fue de 15 ml, que se sometió a dos centrifugaciones consecutivas. La primera centrifugación fue de 10 minutos a 1.800 g. Se recogió el plasma con cuidado de no arrastrar el sedimento, y se sometió a la segunda centrifugación durante 10 minutos a 3.000 g, recogiendo de nuevo el plasma con cuidado de no arrastrar el sedimento.

El plasma obtenido se alícuotó a razón de 1,1 ml en microtubos de 2 ml. Las alícuotas destinadas a cultivos celulares y a la extracción de ADN se almacenaron a 4°C, y se utilizaron en un plazo de 24 horas.

Las muestras de tumores primarios se recogieron en fresco durante el tallado, e inmediatamente se congelaron a -80°C hasta el momento de la extracción del ADN.

2. Extracción de ADN de muestras biológicas humanas.

La extracción de ADN de tumores primarios, muestras de plasma y de fracción celular sanguínea (FCS) de los pacientes con CCR se realizó mediante el "kit" comercial específico de tejidos, plasmas y células denominado “DNeasy Blood and Tissue” (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen de partida de las muestras de plasma fue 1 ml. El volumen de elución final fue de 100 µl para las muestras extraídas de plasma, y de 200 µl para las de tejido y para las de FCS.

Se hicieron cuatro alícuotas de cada ADN extraído. Tres de ellas se conservaron a -20°C, y una se mantuvo a 4°C, mientras se realizaban los análisis por PCR.

3. Cuantificación del ADN total de muestras biológicas humanas.

Las concentraciones de ADN extraído de tumores primarios, muestras de plasma y FCS de pacientes con CCR se valoraron mediante espectrofotometría con el sistema denominado “NanoDrop” (ND-1000 Spectrophotometer, Wilmington, USA). El “NanoDrop” es un espectrofotómetro de amplio espectro que permite analizar 1 µl de muestra con gran precisión, utilizando una tecnología basada en la retención de la muestra sobre una plataforma de medición. Para su utilización se siguieron las instrucciones del fabricante. Al comenzar cada sesión, se descontaminó la superficie de medida con una solución de hipoclorito sódico al 5,25%. Al inicio

de cada sesión se realizó una medición blanco, y ésta se repitió cada tres mediciones de muestras. Se midió la absorbancia a 260 y 280 nm, y se utilizaron 2 µl de cada muestra. Todas las muestras fueron medidas por triplicado, para confirmar la exactitud de los resultados.

4. Detección de mutaciones de K-*ras* humano.

4.1. Detección de mutaciones de K-*ras* mediante PCR en tiempo real.

4.1.1 Detección en muestras de tumores.

La técnica que se empleó para detectar mutaciones en el codón 12 del exón 1 del gen K-*ras* humano, se basó en el uso de oligómeros ácido péptido nucleicos o sondas PNA, combinados con sondas de hibridación denominadas FRET (del inglés, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), en el sistema de PCR cuantitativa en tiempo real denominado “LightCycler” de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania), utilizando la versión 3.5 de su software. En la Figura 4 se muestra un esquema de actuación del sistema FRET-PNA.

La sonda PNA se añadió para inhibir la amplificación de las secuencias no mutadas del gen K-*ras*. Estas sondas son análogos artificiales de ADN. El anillo ribosa-fosfato del ADN es sustituido por una estructura de poliamida (Figura 5). A pesar de este cambio radical estructural, y debido a su estructura química, estas sondas son capaces de unirse a secuencias complementarias de ADN de manera muy específica (Figura 5).

Utilizando esta técnica, se examinó la presencia de mutaciones en el codón 12 del exón 1 de dicho gen (Figura 9):

- Gly12Asp (GGT→GAT).
- Gly12Cys (GGT→TGT).
- Gly12Val (GGT→GTT).

Se utilizaron dos cebadores que amplificaban un fragmento genómico de 164 pares de bases (pb), específico del exón 1 del gen K-*ras*. La secuencia de los cebadores se muestra en la Tabla 2. Fueron sintetizados por Bonsai Technologies Group, S.A (Madrid, España).

Se utilizaron dos sondas de hibridación para cada amplificación, denominadas “sensor” y “anclaje”. La sonda “sensor” fue diseñada para ser complementaria a la mutación puntual de interés en el gen K-*ras*, marcada con el fluoróforo LC-Red705 (longitud de onda de emisión: 705 nm) en el extremo 5’, y fosforilada en el extremo 3’, para evitar su extensión por la Taq ADN polimerasa. Las secuencias de las sondas “sensor” se muestran en la Tabla 2. La sonda de “anclaje” se marcó con fluoresceína (Flu; longitud de onda de emisión: 525 nm) en el extremo

3', y su secuencia fue la misma en todos los casos. Las sondas fueron sintetizadas por TIB MOLBIOL (Berlín, Alemania).

Se añadió sonda PNA, complementaria a los codones 10 a 14 del exón 1 del gen *K-ras*. Su secuencia se muestra en la Tabla 2 y fue sintetizada por Panagene (Daejeon, Corea del Sur).

Para todas las PCRs, se utilizó el "kit" denominado "LightCycler Fast Start DNA MasterPLUS Hyb Probes" de Roche Diagnostics, que contenía la enzima Taq ADN polimerasa, tampón de reacción, MgCl₂ y desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs). La mezcla de reacción tenía un volumen total de 20 µl, conteniendo 1 µM de cada cebador, 0,4 µM de cada una de las sondas fluorescentes, 2 µM de sonda PNA y un mínimo de 55 ng de ADN en un volumen de 2 µl.

En cada PCR se añadió a la mezcla de reacción 1 µl de la enzima Uracil-ADN-glicosilasa (Roche Diagnostics), para evitar posibles contaminaciones por productos amplificados.

En todas las PCRs, se incluyeron muestras de ADN procedentes de tumores con secuencias conocidas de *K-ras* como controles positivos, y agua como control negativo.

Los ciclos de temperatura se programaron de la siguiente forma: 10' a 95°C, para activar a la enzima y producir la desnaturalización del ADN, seguido de 50 ciclos de 2'' a 95°C, 10'' a 70°C, para la unión de la sonda PNA, 7'' a 60°C, para el anillamiento de los cebadores y las sondas FRET, y 15'' a 72°C. La fluorescencia fue detectada en el canal F3/F1 del sistema, siendo F3 el canal que detecta la emisión de fluorescencia de LC-Red 705 (longitud de onda de emisión: 705 nm) y F1 el canal que detecta la emisión de la fluoresceína (longitud de onda de emisión: 525 nm), y analizada en el canal F3/back-F1 del sistema. Este canal es específico para el análisis con sondas de hibridación, utilizando LC-Red 705. Se resta la emisión de la fluoresceína porque, aunque se utiliza como fluoróforo excitador, no es la detección de su fluorescencia lo que interesó para el estudio.

4.1.2 Pruebas de sensibilidad.

Se quiso evaluar la sensibilidad del método de PCR en tiempo real empleado para la detección de mutaciones de *K-ras*. Para ello se hicieron siete diluciones de una muestra de ADN tumoral con mutación Gly12Cys (confirmada mediante secuenciación) en agua. Se hicieron diluciones de 1:10 a 1:4000. Para hacer la pruebas se utilizó la sonda "sensor"-TGT.

4.1.3 Detección en muestras de plasmas.

Las muestras de plasmas se analizaron mediante tres PCRs en tiempo real con sondas FRET (Figura 10), con el mismo protocolo descrito para el análisis del ADN de tumores modificando únicamente la cantidad de ADN de partida, que en este caso fue un mínimo de 2 ng en un volumen de 2 µl. Primero, se amplificó la totalidad de las secuencias del gen *K-ras* de cada muestra (ADN mutado y no mutado) en una PCR sin sonda PNA para comprobar la existencia de ADN amplificable. En las otras dos se añadió sonda PNA, de tal manera que sólo amplificaran las secuencias mutadas. La diferencia entre ellas fue la secuencia de la sonda "sensor", ya que

una era complementaria a la mutación Gly12Asp, y en la otra a Gly12Cys. De esta forma se trató de ver con cual de ellas se obtenía más señal fluorescente, para así tratar de aproximar cual era la mutación presente, si la había. Se pusieron tres réplicas por muestra. Cuando se detectó ADN mutado al menos en una réplica de cada muestra, esa muestra fue considerada positiva a la detección de *K-ras* mutado.

En las PCRs sin sonda PNA se incluyeron los siguientes controles: ADN procedente de tumores con secuencias conocidas de *K-ras* y ADN de plasmas de voluntarios sanos como controles positivos, y agua como control negativo. En las PCRs con sonda PNA, se incluyeron las mismas muestras control, aunque en este caso las extraídas de voluntarios sanos no eran controles positivos, sino negativos.

NOMBRE	SECUENCIA
Cebador “forward” (5'→3')	aaggcctgctgaaaatgactg
Cebador “reverse” (5'→3')	ggtcctgcaccagtaatatgca
Sonda “sensor”-GAT	LC-Red705-ttgctacgccATCagctccaa-P
Sonda “sensor”-TGT	LC-Red705-ttgctacgccACAagctccaa-P
Sonda “sensor”-GTT	LC-Red705-ttgctacgccAACagctccaa-P
Sonda “anclaje”	cgtccacaaaatgattctgaattagctgtatcgtaaggcact-Flu
Sonda PNA	NH-cctacgccaccagctcc-CONH

Tabla 2. Secuencias de los cebadores, sondas FRET y sonda PNA utilizados en los análisis por PCR en tiempo real. Flu: fluoresceína; LC-Red 705: fluoróforo denominado LightCycler-Red 705; P: grupo fosfato; PNA: Peptide Nucleic Acid.

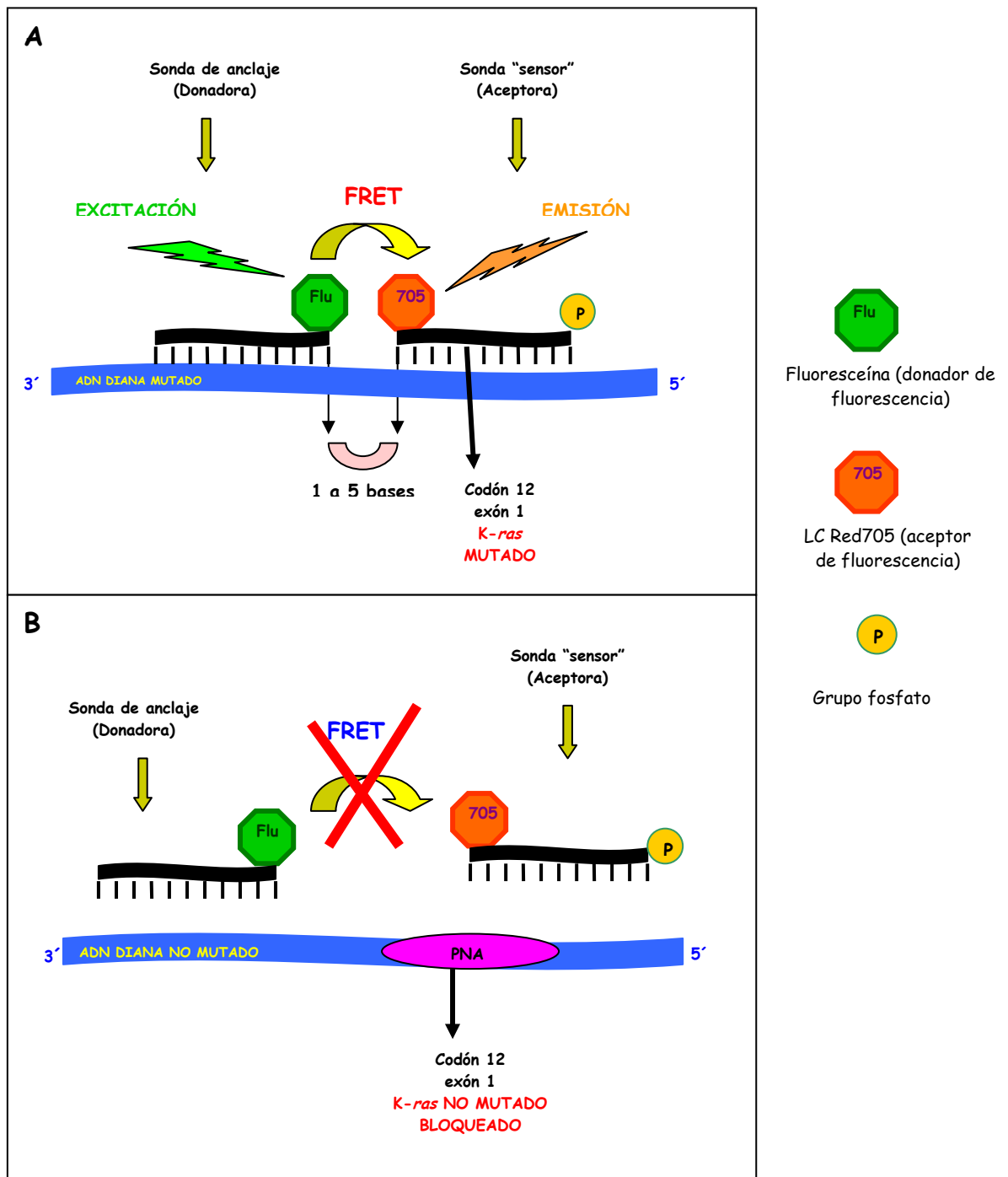


Figura 4. Sistema FRET-PNA para la detección de mutaciones puntuales en el codón 12 del exón 1 del gen K-ras humano. **A:** unión de las sondas FRET al ADN con mutación en K-ras; **B:** bloqueo de la secuencia no mutada de K-ras por la sonda PNA.

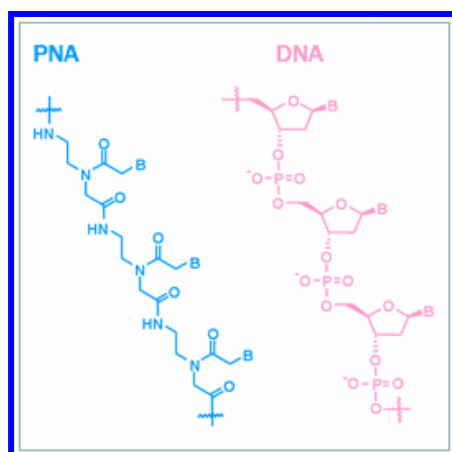


Figura 5. Comparación de la estructura química de la sonda PNA y una molécula de ADN.

4.2. Detección de mutaciones de K-ras mediante secuenciación.

El ADN extraído de los tumores primarios se sometió a un proceso de secuenciación del exón 1 del gen K-ras, para confirmar el resultado obtenido en el análisis anterior por PCR (Figura 9). Para ello, en primer lugar se realizó la amplificación mediante PCR, de una secuencia específica de 286 pb. La mezcla de reacción tenía un volumen total de 50 μ l, conteniendo 0,2 μ M de cada cebador (Bonsai Technologies Group, S.A), 0,2 mM de dNTPs (Biotools B&M Labs, S.A; Madrid, España), 4 μ l de tampón 10x (Biotools B&M Labs, S.A), 1,5 mM $MgCl_2$ (Biotools B&M Labs, S.A), 1U de Taq ADN Polimerasa (Biotools B&M Labs, S.A), y 250 ng de ADN en un volumen de 5 μ L. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 3.

Los ciclos de temperatura se programaron de la siguiente forma: 5' a 94°C, para activar a la enzima, seguido de 35 ciclos de 30'' a 94°C, 30'' a 52 °C y 45'' a 72°C, con una extensión final de 7' a 72°C .

Seguidamente, se iniciaba el proceso de marcaje del ADN para secuenciación, a partir de 6 μ L del producto de PCR, utilizando el “kit” comercial “BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 Ready Reaction” (Applied Biosystems; Foster City, CA, EE.UU.). La secuenciación se realizó en un secuenciador automático 3100xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems), utilizando la versión 5.2 de su software, y estuvo a cargo del Servicio de Secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (Madrid).

NOMBRE	SECUENCIA
Cebador “forward” (5′→3′)	tactggtggagtatttgatagt
Cebador “reverse” (5′→3′)	catgaaaatggtcagagaaacc

Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados en los análisis de secuenciación del ADN de tumores primarios de pacientes con CCR.

5. Líneas celulares y métodos de cultivo.

En el presente trabajo se han utilizado tres líneas celulares: hASCs (del inglés, *human Adipose Stem Cells*, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano), NIH-3T3 (fibroblastos de ratón inmortalizados), y SW-480 (células de adenocarcinoma de colon humano; Figura 6).

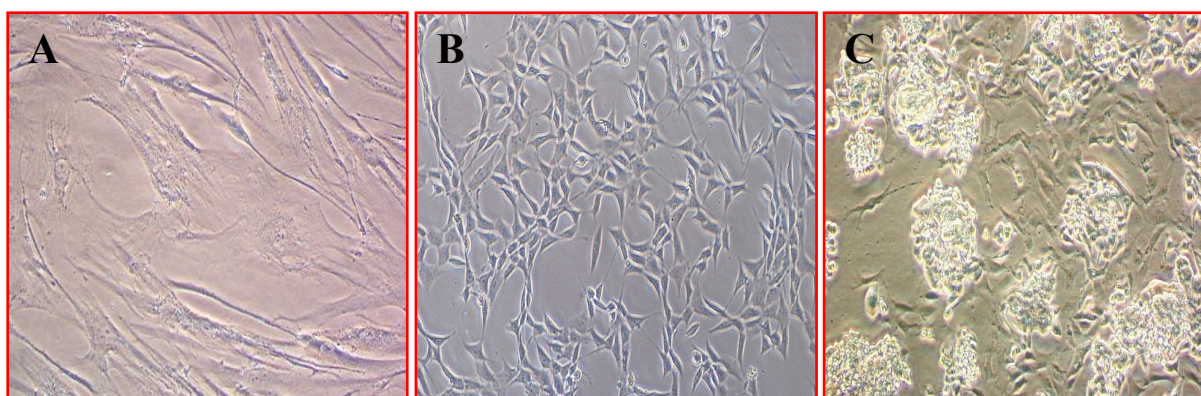


Figura 6. Fotografías de las líneas celulares utilizadas en los experimentos. Microscopía óptica de contraste de fases. **A:** células hASCs; **B:** células NIH-3T3; **C:** células SW-480.

Las células hASCs fueron obtenidas por liposucción de pacientes sin patología tumoral, según el protocolo publicado por Zuk y cols. en 2001 (Zuk *et al.*, 2001), y modificado posteriormente por García Olmo y cols. (García-Olmo *et al.*, 2003). Brevemente, se obtuvieron aproximadamente 100 ml de lipoaspirado mediante cirugía plástica (Figura 7A). El lipoaspirado se lavó varias veces con tampón fosfato salino (Gibco, Paisley, Gran Bretaña; Figura 7B). Se digirió con collagenasa tipo I (Gibco) a una concentración final de 0,075% (p/v), en tampón fosfato salino durante 45' a 37 °C en agitación constante, con el fin de liberar la fracción celular. Transcurrido el tiempo de digestión, se añadió al producto digerido el medio de cultivo denominado Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco) con un 10% de suero fetal bovino (Gibco) y un 1% de penicilina/estreptomicina 10,000 U/ml/10,000 µg/ml (Gibco), para inactivar la collagenasa. El producto resultante fue centrifugado a 300 g durante 10' y el sedimento celular se lavó con tampón fosfato salino. El sedimento celular se centrifugó de nuevo

a 300 g durante 10 minutos, y se trató con NH_4Cl 0,16 M a temperatura ambiente para lisar los eritrocitos que pudieran haber quedado en la muestra (Figura 7C). Las células se lavaron con tampón fosfato salino, se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en DMEM con un 10% de suero fetal bovino y un 1 % de penicilina/estreptomicina. Se realizó un recuento celular con cámara de Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania), y se sembraron las células en placas “Petri” de 100 mm (Figura 7D).

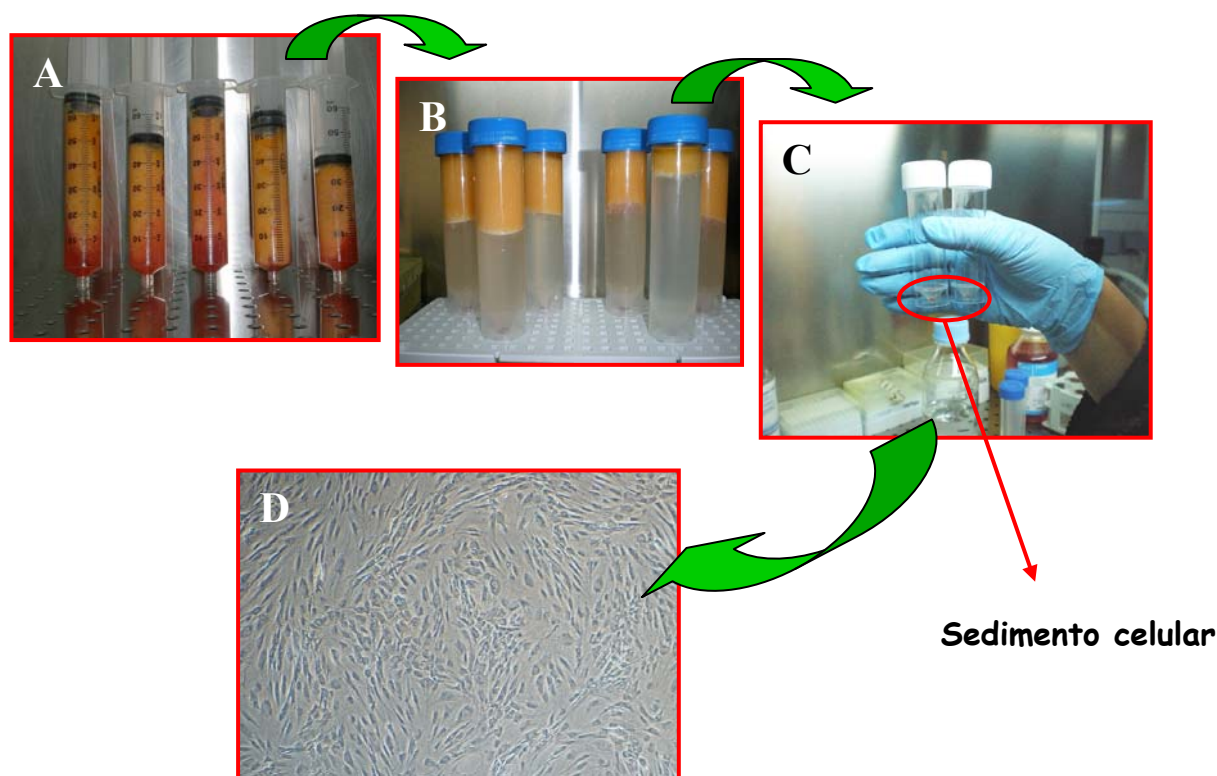


Figura 7. Fotografías de parte del proceso de extracción de las células hASCs a partir de lipoaspirado humano. **A:** lipoaspirado de grasa humana; **B:** lipoaspirado tras ser lavado y centrifugado con tampón fosfato salino; **C:** sedimento celular tras tratar el lipoaspirado con collagenasa tipo I; **D:** células hASCs en cultivo después de cinco días de ser extraídas y sembradas.

Las células NIH-3T3 y SW-480 fueron cedidas por el Dr. Antonio Bernad Miana, del Departamento de Cardiología Regenerativa del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC, Madrid).

Las tres líneas fueron cultivadas con un medio compuesto por 89% de DMEM, 10% de suero fetal bovino, y 1% de penicilina/estreptomicina. El mantenimiento de las tres líneas se realizó en placas “Petri” de 100 mm, y se dispersaron con 1 ml de tripsina-EDTA al 0,05% (Gibco) para realizar los correspondientes subcultivos, cuando alcanzaban un 80% de confluencia.

En todos los casos, y durante el tiempo de duración del estudio, las tres líneas se testaron periódicamente para detectar posibles contaminaciones por micoplasma utilizando el “kit” “MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit” (Lonza, Rockland, MD, EE.UU.). El test se basa en

el aumento en la producción de adenosin trifosfato (ATP) por enzimas del microorganismo, que se liberan cuando éste se encuentra presente en el cultivo celular. El incremento de ATP es detectado mediante una reacción bioluminiscente y la intensidad de luz emitida es directamente proporcional a la concentración de ATP que se produce. La medición de la reacción enzimática se realizó mediante luminometría en un luminómetro Wallac Microbeta® TriLux (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EE.UU).

5.1 Cultivo de células hASCs y NIH-3T3 con ADN libre extraído de tumores de pacientes con CCR.

Se preparó una solución de 20 µg de ADN genómico extraído de tejido tumoral (Figura 9), y positivo a la detección de *K-ras* mutado, en CaCl_2 2 M (solución A). Posteriormente, esta solución A se añadió, en agitación, a una solución B compuesta por NaCl 5 M, ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) 1 M/pH 7,1 y fosfato sódico 70 mM/pH 7,1. La mezcla se mantuvo 15' a temperatura ambiente. Seguidamente, la solución A+B se añadió a placas "Petri" de 60 mm, en las que el día anterior se habían sembrado células NIH-3T3 ó hASCs ($7,5 \times 10^5$ y 5×10^5 respectivamente -"procedimiento 1"-, o bien 1×10^5 células en ambos casos -"procedimiento 2"-).

Tras incubar 5 h a 37°C y 5% de CO_2 , se aspiró la solución de cada placa, se lavaron tres veces con tampón fosfato salino, y se les añadió medio de cultivo habitual.

En el "procedimiento 1", tanto las hASCs como las NIH-3T3 se mantuvieron en cultivo 30 días, sin realizar ningún pase. Al finalizar el experimento, se disgregaron con tripsina-EDTA al 0,05 % y se extrajo el ADN de las mismas para detectar la presencia de secuencias mutadas y no mutadas de *K-ras* humano por PCR en tiempo real.

En el "procedimiento 2", tanto las hASCs como las NIH-3T3 se cultivaron durante 30 días, pero se disgregaron cuando alcanzaban un 80% de confluencia, con 0,5 ml de tripsina-EDTA al 0,05 %, y se neutralizaron con 5 ml de medio de cultivo habitual. De éstos, 1 ml se sembró de nuevo en placa y los 4 restantes se centrifugaron 5' a 300 g; así se recuperó el sedimento para la extracción de ADN en cada uno de los pases. Al finalizar el ensayo se analizó el ADN extraído en cada pase en busca de secuencias mutadas y no mutadas de *K-ras* humano por PCR en tiempo real.

Siguiendo el "procedimiento 1", se hicieron cultivos de células NIH-3T3 con ADN tumoral con mutación Gly12Asp, con ADN con mutación Gly12Val, con ADN no mutado y con ADN procedente de FCS de voluntarios sanos, 5 réplicas de cada uno. También se realizó el ensayo en 5 cultivos de células hASCs con ADN con mutación Gly12Asp y 5 con ADN con mutación Gly12Val. Cada réplica se realizó con ADN de un paciente diferente. En cada ensayo se cultivaron en paralelo células hASCs y NIH-3T3 con su medio habitual, como controles negativos.

Siguiendo el “procedimiento 2”, se realizó un ensayo de transfección en un cultivo de células NIH-3T3 con ADN con mutación Gly12Asp, uno con ADN con mutación Gly12Val, uno con ADN con mutación Gly12Cys, uno con ADN sin mutación en *K-ras*, y uno con ADN procedente de FCS de un voluntario sano. Al igual que con el “procedimiento 1”, en cada ensayo se cultivaron células hASCs y NIH-3T3 con su medio habitual como controles negativos.

5.2 Cultivo de células hASCs y NIH-3T3 con plasmas de pacientes con CCR.

Se utilizaron dos protocolos diferentes para cultivar células con plasmas humanos: adición directa del plasma a las células, en placas de cultivo estándar, y adición del plasma sin contacto directo con las células, en un sistema de placas con membrana denominado Transwell® (Figuras 8 y 10). En ambos casos, no transcurrían más de 24 h desde la extracción de la muestra sanguínea de los pacientes hasta la adición de plasma a los cultivos. Durante ese tiempo se conservaron a 4°C.

Para cada experimento se comprobó mediante PCR en tiempo real que el plasma utilizado portaba la mutación tumoral esperada y que el de voluntario sano no portaba ninguna mutación en el codón 12 del exón 1 del gen *K-ras*.

Para el cultivo directo con el plasma humano, se utilizaron los plasmas de 12 pacientes de cáncer para generar una matriz de fibrina en la cual se sembraban las células hASCs y las NIH-3T3, a razón de 100.000 células por placa. Dicha matriz se generó con 1,5 ml del plasma del paciente y 1,5 ml de medio de cultivo habitual de las células (89% DMEM, 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomicina), más un suplemento de CaCl_2 a una concentración de 0,7 mg/ml respecto al volumen total, para favorecer la formación de la matriz. Las células estuvieron incluidas en la matriz durante 10 días, al cabo de los cuales se procedió a su liberación utilizando colagenasa tipo I a una concentración de 4,5 mg/ml. A continuación, se neutralizó la enzima con 5 ml de medio de cultivo y se realizó un recuento de las células obtenidas y un análisis de la viabilidad celular utilizando azul tripán (Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.). De esos 5 ml, uno se volvió a sembrar de nuevo en placas “Petri” de 60 mm y los 4 restantes se centrifugaron 5’ a 300 g, y así se recuperó el sedimento para la extracción de ADN. Se realizaron pases cada vez que las células alcanzaron el 80% de confluencia de manera que, como se ha descrito anteriormente, en cada pase, una parte de las células se destinó a la extracción de ADN, para detección de las secuencias mutadas y no mutadas de *K-ras* humano mediante PCR en tiempo real.

Los cultivos se mantuvieron durante un mes; es decir, 20 días más tras la retirada del coágulo. Las células obtenidas en el último pase se inocularon en ratones inmunodeficientes NOD-SCID, para estudiar la posible transformación oncogénica, como se describirá más adelante.

En paralelo a cada experimento, se incluyeron como controles negativos células hASCs y NIH-3T3 cultivadas normalmente (sin adición de plasma), y cultivadas con el plasma de voluntarios sanos.

Para el cultivo en placas con membrana, se utilizó el plasma de un paciente de cáncer, y el correspondiente control de células cultivadas con plasma de un sujeto sano y de células sin adición de plasma. Se utilizaron placas de seis pocillos tipo Transwell® (Figura 8), de la marca Corning (Lowell, USA), con poros de $0,4\ \mu\text{m}$ de diámetro. En el fondo de los pocillos se sembraron las células hASCs ó NIH-3T3, y se añadió el plasma sobre la membrana, que posteriormente se coaguló, gracias a la adición de CaCl_2 . Al igual que se realizaba en los cultivos directos con plasma, se partió siempre de 100.000 células y de 1,5 ml de cada plasma. Dado que la superficie de los pocillos de este tipo de placas era aproximadamente tres veces inferior a las de las tipo “Petri” de 60 mm, se emplearon 3 pocillos por experimento, en cada uno de los cuales se sembraron 33.000 células y se añadió 0,5 ml de plasma. El resto del procedimiento se hizo de la misma forma descrita para el cultivo directo con plasma.

Al cabo de 10 días, las membranas se retiraban de los pocillos y se sometían a un protocolo de fijación para realizar estudios de microscopía óptica y electrónica para comprobar la ausencia de células en los plasmas. Los Transwell® fueron fijados primero en glutaraldehído al 3,5 % (30' a 37°C) y después en tetróxido de osmio (2 h). Posteriormente se lavaron, deshidrataron y se embebieron en Araldita® (Durcupan, Fluka BioChemika, Ronkonkoma, Nueva York, EE.UU.). Se hicieron cortes seriados semifinos de $1,5\ \mu\text{m}$ con un cuchillo de diamante, y se tiñeron con un 1% de azul de toluidina para localizar los poros de la membrana. Para identificar las células y las partículas dentro de las membranas, se cortaron secciones ultrafinas de $0,05\ \mu\text{m}$ con un cuchillo de diamante, se tiñeron con citrato de plomo y se examinaron con un microscopio electrónico FEI Tecnai Spirit (Hillsboro, OR, EE.UU.).

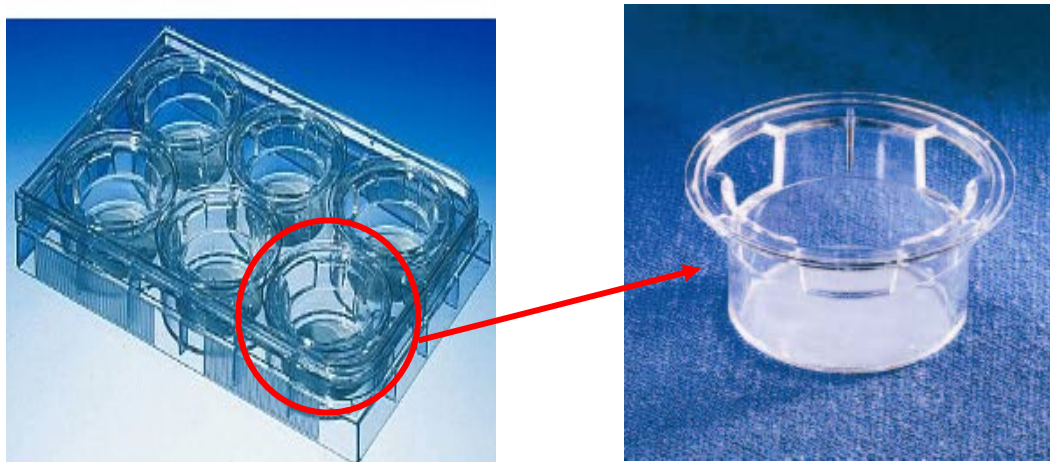


Figura 8. Sistema de membranas (Transwell®) de $0,4\ \mu\text{m}$ de diámetro de poro utilizadas para el cultivo de células hASCs y células NIH-3T3 con plasmas de pacientes de CCR.

5.3. Cuantificación de ADN mutado por PCR en tiempo real.

Se cuantificaron las secuencias que portaban la mutación Gly12Asp en las muestras de tumores primarios y en los plasmas empleados para el cultivo de células no tumorales (Figuras 9 y 10). Para ello, se generó una curva estándar. Para obtener la curva, se realizó la amplificación de nueve réplicas de ADN de un tumor con la mutación Gly12Asp mediante PCR en tiempo real. Una vez finalizada la PCR, se recuperaron los productos amplificados y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1 % en tampón Tris-acetato-EDTA (TAE) con bromuro de etidio 0,5 µg/ml. Las bandas de ADN fueron visualizadas mediante un sistema de fotodocumentación modelo IP-010-SD de Vilber Lourmat (Torcy, Marne La Vallée, France), se cortaron con un bisturí y se purificó el ADN con el “kit” comercial “DNA Gel Extraction Kit” (Millipore Corporation, Bedford, MA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se valoró la concentración total del ADN mediante “NanoDrop” y se procedió a la obtención de los patrones o “estándares” para generar la curva. Para ello, se realizaron doce diluciones con agua MilliQ (Purite Select BiOClub, Durviz S.L. Paterna, Valencia), y se valoró la concentración de ADN de cada dilución con “Nanodrop”. Se realizó una PCR cuantitativa de las diluciones y así se obtuvo la curva estándar externa. Para ser aceptada como válida, la curva tuvo que cumplir tres requisitos:

- La pendiente (“slope”) debía ser menor de -2,9 (da idea de la eficiencia de la reacción).
- El error debía ser menor de 0,1 (informa sobre las variaciones entre muestras -errores experimentales de “pipeteo”-).
- El coeficiente de regresión (R) debía ser igual a 1 (da información sobre errores sistemáticos, por ejemplo, el error acumulado al hacer las diluciones seriadas).

La curva generada comprendió cantidades entre $5,9 \times 10^3$ pg y $7,1 \times 10^{-5}$ pg. La pendiente fue de -3,521 y el coeficiente de regresión de 1. La gráfica fue creada con el logaritmo de la concentración de ADN frente al número de ciclos y las unidades en las que se realizaron las cuantificaciones fueron pg/reacción.

Una vez obtenida la curva estándar, se procedió a realizar las PCRs de las muestras de ADN de los tumores primarios y de los plasmas. En cada sesión se pusieron 3 réplicas por muestra y se incluyeron 4 estándares. Siempre que se pudo, la cuantificación se realizó con los estándares introducidos en cada sesión. Cuando la curva generada por los estándares no cumplió los requisitos mencionados anteriormente, se recurrió a la curva estándar externa. Se estableció como referencia el que la desviación estándar de los ciclos umbral de las tres réplicas no superase los 0,5 ciclos. Si en algún caso se superaba este límite, se repitió la PCR.

Los controles de cada PCR fueron los siguientes: ADN de tejido tumoral con mutación en *K-ras* como control positivo, y como controles negativos ADN de tejido tumoral con *K-ras* no mutado, ADN de plasma de un voluntario sano y agua.

Los estándares se mantuvieron a 4°C mientras se realizaban las distintas PCRs. En el momento en el que se observó variabilidad en los ciclos umbral de los estándares, se hicieron nuevas diluciones a partir de una nueva alícuota de la solución original.

Los valores obtenidos por el aparato reflejaban la cantidad de ADN mutado (en pg) que había en los 2 µl de volumen de muestra de partida. A partir de esos resultados se calculó la cantidad de ADN mutado que había por muestra de plasma y de ADN tumoral utilizado para los ensayos de transfección y cultivo de células no tumorales de la siguiente forma:

- Para calcular la cantidad de ADN mutado por ml de plasma (pg/ml), se utilizó la siguiente fórmula: $x \text{ pg} / 2 \text{ } \mu\text{l} \times 100 \text{ } \mu\text{l} \times 1 \text{ ml}$; dónde x son los pg de *K-ras* mutado que estaban contenidos en 2 µl (los que se pusieron de cada muestra para hacer las PCRs) que procedían de 100 µl de ADN (volumen de elución obtenido al extraer el ADN de los plasmas) y 1 ml fue el volumen de partida de plasma.
- Cantidad de secuencias mutadas en el ADN del tumor primario (pg): $x \text{ pg} / 2 \text{ } \mu\text{l} \times 200 \text{ } \mu\text{l}$; dónde x son los pg de *K-ras* mutado que estaban contenidos en 2 µl (los que se pusieron de cada muestra para hacer las PCRs) que procedían de 200 µl de ADN (volumen de elución obtenido al extraer el ADN de los tumores).

5.3.1 Análisis estadísticos.

Se compararon las medias de las cantidades de secuencias mutadas que había en las muestras de plasmas y de ADN tumoral de los tejidos con los que se realizaron los ensayos de transfección y cultivo de las células hASCs y NIH-3T3, utilizando el test de la *t* de Student para distribuciones normales. Se consideró que los valores eran estadísticamente significativos cuando el p valor fue menor de 0,05.

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad InStat, versión 3.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE.UU).

5.4 Cultivo de células hASCs y NIH-3T3 con sobrenadante de cultivos de células SW-480.

Las células SW-480 se cultivaron hasta llegar a un 80% de confluencia. En ese momento, se recogió el sobrenadante de cada placa. La mitad se sometió a las mismas condiciones de centrifugación que las descritas para los plasmas de pacientes cancerosos, y la otra mitad se reservó sin centrifugar (Figura 11). Ambos medios (centrifugado y sin centrifugar) se almacenaron a 4 °C hasta el momento de realizar los cultivos.

Se utilizaron dos protocolos. En el primero se fijaron tres tiempos: 3, 7 y 15 días. Se sembraron dos placas “Petri” de 60 mm por cada tipo de sobrenadante (centrifugado y no centrifugado) y línea celular (hASCs y NIH-3T3), y en cada cambio de medio se añadió sobrenadante de las células SW-480, reservado a 4°C, centrifugado o sin centrifugar, según

correspondiera. A los 3, 7 y 15 días se tripsinizaron las células hASCs y NIH-3T3 con 0,5 ml de tripsina-EDTA y se extrajo el ADN para realizar PCR en tiempo real para la detección de secuencias mutadas de K-*ras* humano (Tabla 4). Siguiendo este protocolo se hizo un cultivo con células hASCs y otro con células NIH-3T3.

El segundo protocolo fue, en esencia, igual que el antes descrito, con la salvedad de que no se establecieron tiempos para tripsinizar las células, sino que las células estuvieron en cultivo 15 días, durante los cuales las hASCs se subcultivaron dos veces y las NIH-3T3 tres veces (Tabla 4). Al igual que en el primer protocolo, en cada pase se obtuvo el ADN de las células para la detección de las secuencias mutadas de K-*ras*. Siguiendo este protocolo se hizo un cultivo con células hASCs y dos con células NIH-3T3.

1 ^{er} Protocolo	Células hASCs	Células NIH-3T3
Día 3	Sobrenadante centrifugado	Sobrenadante centrifugado
	Sobrenadante no centrifugado	Sobrenadante no centrifugado
Día 7	Sobrenadante centrifugado	Sobrenadante centrifugado
	Sobrenadante no centrifugado	Sobrenadante no centrifugado
Día 15	Sobrenadante centrifugado	Sobrenadante centrifugado
	Sobrenadante no centrifugado	Sobrenadante no centrifugado
2 ^o Protocolo	Células hASCs	Células NIH-3T3
1 ^{er} pase	Sobrenadante centrifugado	Sobrenadante centrifugado
	Sobrenadante no centrifugado	Sobrenadante no centrifugado
2 ^o pase	Sobrenadante centrifugado	Sobrenadante centrifugado
	Sobrenadante no centrifugado	Sobrenadante no centrifugado
3 ^{er} pase		Sobrenadante centrifugado
		Sobrenadante no centrifugado

Tabla 4. Esquema de las condiciones de cultivo de las células hASCs y NIH-3T3 con el sobrenadante de las células SW-480, centrifugado y no centrifugado.

5.5 Análisis molecular de cultivos de células hASCs y NIH-3T3.

5.5.1 Detección de secuencias mutadas y no mutadas de K-*ras* humano.

Se analizaron las secuencias mutadas y no mutadas del gen K-*ras* humano en las células hASCs y NIH-3T3 cultivadas con ADN libre extraído de tumores, con plasmas, y con sobrenadante procedente de células SW-480 (Figuras 9, 10 y 11). La extracción de ADN de las células se realizó mediante el "kit" comercial "DNeasy Blood and Tissue" (Qiagen), según las instrucciones del fabricante para la extracción de ADN de células. La extracción se realizó generalmente, a continuación de finalizar el cultivo. Si no se pudo realizar en las horas siguientes, el sedimento se resuspendió en 210 µl de PBS y se conservó a -20°C. Tras la extracción de ADN, las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis por PCR.

Para la detección de mutaciones en el codón 12 del exón 1 del gen K-*ras*, se utilizó la misma técnica de PCR en tiempo real descrita para las muestras de tumores y plasmas.

5.5.2 Detección de secuencias mutadas y no mutadas de k-*ras* murino.

Cada muestra se sometía a dos PCRs: una para detectar ADN mutado, y otra para no mutado. Se analizaron las secuencias mutadas y no mutadas del gen k-*ras* murino en las células NIH-3T3 transfectadas con ADN libre extraído de tumores y cultivadas con los plasmas (Figuras 9 y 10). La técnica que se empleó para detectar la mutación Gly12Asp del codón 12 del exón 1 fue la denominada MASA (modificación de la técnica original por Fernández-Vega C. *et al*, 2002) en un termociclador "iCycler" (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU). Se utilizaron dos cebadores "forward", uno para la detección del ADN mutado Gly12Asp y otro para la detección del ADN no mutado (Bonsai Technologies Group, S.A). El cebador "reverse" fue el mismo para ambas reacciones (Bonsai Technologies Group, S.A). El fragmento de ADN genómico amplificado fue de 140 pb. En la Tabla 5 se muestra la secuencia de los cebadores.

La mezcla de reacción para PCR tenía un volumen total de 50 µl, conteniendo un mínimo de 20 ng de ADN en un volumen de 5 µl. Para evitar reacciones inespecíficas (falsos positivos), la cantidad de ADN no excedió de 250 ng. La mezcla de reacción contenía 0,8 µM de cada cebador, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 5 µl de tampón 10x y 0,4 U de Taq ADN Polimerasa (Roche Diagnostics).

Los ciclos de temperatura se programaron de la siguiente forma: 10' a 94°C, para activar la enzima, seguido de 35 ciclos de 1' a 94°C, 30'' a 63 °C y 45'' a 72°C, con una extensión final de 10' a 72°C.

Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 3% en tampón TBE, que contenía bromuro de etidio a una concentración de 2 µg/ml. Las bandas de ADN fueron visualizadas mediante un sistema de fotodocumentación modelo IP-010-SD de Vilber Lourmat.

Para cada PCR se incluyó una muestra de agua como control negativo, y ADN extraído de células NIH-3T3 como control positivo para la detección de ADN no mutado y negativo para la de ADN mutado.

NOMBRE	SECUENCIA
Cebador “forward-GAT” (5′→3′)	cttggtggtggttgagctga
Cebador “forward-GGT” (5′→3′)	cttggtggtggttgagctgg
Cebador “reverse” (5′→3′)	ctgccgtcctttacaagcgca

Tabla 5. Secuencias de los cebadores utilizados en los análisis de MASA para amplificar secuencias mutadas y no mutadas de *k-ras* murino en las células NIH-3T3 transfectadas con ADN libre procedente de tumores colorrectales humanos y cultivadas con plasmas de pacientes. El cebador “forward-GAT” se utilizó para la amplificación de la mutación Gly12Asp y el “forward-GGT” para la amplificación de las secuencias no mutadas.

5.5.3 Detección de secuencias de p53 humano.

Se utilizó una técnica de amplificación alelo-específica por PCR para analizar la expresión del polimorfismo ARG/PRO del codón 72 del exón 4 del gen p53, (Storey *et al.*, 1998) en las muestras de ADN de células NIH-3T3 transfectadas con ADN tumoral y cultivadas con plasmas de pacientes de cáncer (Figuras 9 y 10). Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 6.

CEBADORES	Cebador “forward” (5′→3′)	Cebador “reverse” (5′→3′)
Arg	tcccccttgccgtccaa	ctggtgcaggggccacgc
Pro	gccagaggctgctcccc	cgtgcaagtcacagactt

Tabla 6. Secuencias de los cebadores utilizados para la detección del polimorfismo de p53 humano en las células NIH-3T3 transfectadas con ADN libre procedente de tumores y cultivadas con plasmas de pacientes.

Cada muestra se sometía a dos PCRs: una para amplificar la secuencia que codifica ARG y otra para la de PRO. Todas las amplificaciones fueron realizadas con un mínimo de 20 ng de ADN en un volumen total de 20 µl. La mezcla de reacción estaba compuesta por 2 µl de tampón [75 mM de Tris-HCl, 2 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl y 20 mM de (NH₄)₂SO₄], 200 µM de dNTPs, 0,4 U de Taq ADN Polimerasa (Biotools, Madrid) y 10 pmoles de cada uno de los cebadores (Bonsai Technologies Group, S.A).

Los ciclos de temperatura se programaron de la siguiente forma: 5' a 94°C, para activar la enzima, seguido de 40 ciclos de 15'' a 94°C, 10'' a 62 °C y 10'' a 72°C, con una extensión final de 10' a 72°C y se realizaron en un termociclador “iCycler”.

Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 3% en TBE con bromuro de etidio a una concentración de 2 µg/ml. Las bandas de ADN fueron visualizadas mediante el mencionado sistema de fotodocumentación.

Para cada PCR se incluyeron dos controles negativos: una muestra con agua y ADN extraído de células NIH-3T3, y un control positivo de ADN humano de un individuo heterocigoto para este polimorfismo.

5.5.4 Detección de secuencias que codifican la β -globina humana.

Se amplificó por PCR un fragmento específico del gen de la β -globina humana en las muestras de ADN de células NIH-3T3 transfectadas con ADN tumoral y cultivadas con plasmas de pacientes con CCR (Figuras 9 y 10). Los cebadores utilizados (Bonsai Technologies Group, S.A) se muestran en la Tabla 7.

NOMBRE	SECUENCIA
Cebador "forward" (5'→3')	actcccaggagcagggaggg
Cebador "reverse" (5'→3')	tggtctccttaaacctgtct

Tabla 7. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de secuencias de β -globina humana en las células NIH-3T3 transfectadas con ADN libre procedente de tumores y cultivadas con plasmas de pacientes de cáncer.

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo con un mínimo de 20 ng de ADN en un volumen total de 50 µl. La mezcla de reacción contenía 10 µM de cada uno de los cebadores (Bonsai Technologies Group, S.A), más 25 µl de Taq PCR Master Mix (Qiagen), la cual estaba formada por 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U de Taq ADN Polimerasa y 10 mM de Tris-HCl.

Para cada PCR se incluyeron dos controles negativos constituidos por una muestra con agua y ADN extraído de células NIH-3T3, y un control positivo de ADN humano normal.

Los ciclos de temperatura se programaron de la siguiente forma: 7' a 94°C, para activar la enzima, seguido de 45 ciclos de 1' a 94°C, 1' a 60 °C y 2' a 72°C, con una extensión final de 10' a 72°C. La PCR se realizó en un termociclador “iCycler” y el fragmento de ADN genómico amplificado fue de 249 pb.

Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 3% en TBE, con bromuro de etidio a una concentración de 2 µg/ml. Las bandas de ADN se visualizaron con el sistema de fotodocumentación mencionado anteriormente.

6. Ensayo *in vivo*: inoculación de células hASCs y NIH-3T3 cultivadas con plasmas de pacientes con CCR, en ratones inmunodeficientes.

Se emplearon ratones NOD-SCID (Figura 10), machos de 9 semanas de edad, suministrados por Charles River (Charles River, Barcelona). La estabulación se realizó en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Madrid. Los factores ambientales y la manipulación de los animales se ajustaron a las recomendaciones de la Directiva Comunitaria sobre animales de experimentación (86/609/CEE) y a la legislación española (Real Decreto 1201/2005). Se alimentaron con pienso estándar para la especie (Harlan Interfauna Ibérica S.A., Barcelona) y agua *ad libitum*.

Se establecieron varios grupos para cada experimento:

- a) Grupo I (n= 4): animales inoculados con células NIH-3T3 cultivadas con su medio de cultivo habitual.
- b) Grupo II (n= 5): animales inoculados con células hASCs cultivadas con su medio de cultivo habitual.
- c) Grupo III (n= 3): animales inoculados con células NIH-3T3 cultivadas con plasmas de voluntarios sanos. 2 de ellos fueron inoculados con células NIH-3T3 que estuvieron en contacto directo con el plasma humano, y 1 con células NIH-3T3 cultivadas con plasma humano en el sistema de Transwell®.
- d) Grupo IV (n= 4): animales inoculados con células hASCs cultivadas con plasmas de voluntarios sanos. 3 fueron inoculados con células hASCs que estuvieron en contacto directo con el plasma humano, y 1 con células hASCs cultivadas con plasma humano en el sistema Transwell®.
- e) Grupo V (n= 3): animales inoculados con células SW-480.
- f) Grupo VI (n= 5): animales inoculados con células NIH-3T3 cultivadas con los plasmas de pacientes de CCR. 4 de ellos se inocularon con células NIH-3T3 que estuvieron en contacto directo con el plasma humano, y 1 con células NIH-3T3 cultivadas con plasma humano en Transwell®.
- g) Grupo VII (n= 6): animales inoculados con células hASCs cultivadas en contacto directo con los plasmas de pacientes.

En cada animal del grupo V se inocularon subcutáneamente 1×10^6 células en 0,25 ml de PBS estéril, en la zona dorso-lumbar, sin anestesia. En el resto de los grupos se inocularon todas las células obtenidas en el último pase de cada cultivo, excepto un 10% que fue utilizado para la extracción de ADN. Se utilizaron jeringas de 1 ml (Tyco Healthcare, Northern Ireland, Gran Bretaña) y agujas de 23G (BD Eclipse Needle, Franklin Lake, NJ, EE.UU.). Este método fue previamente probado y depurado por nuestro equipo (García-Olmo *et al.*, 1999).

Tras la inoculación, se valoró semanalmente el crecimiento tumoral en cada animal mediante la medición del diámetro mayor del tumor con un calibre. Cuando el diámetro aumentó más de 0,5 cm de una semana a otra, el control fue de dos veces a la semana. Se realizó un seguimiento fotográfico durante el tiempo que duró el experimento. Los animales fueron sacrificados entre el día 32 y el 36 posteriores a la inyección de las células bajo anestesia con 2,5-3% de isoflurano. Se realizó una punción cardíaca con la que se extrajeron entre 0,7 y 1 ml de sangre, realizando así la exanguinación completa que terminaba con la muerte del animal. Las muestras sanguíneas se depositaron en tubos con EDTA. En todos los animales se realizó un estudio necrópsico dirigido por el veterinario. Se midió con un calibre y se extrajo el tumor primario, pulmones, hígado y ganglios mesentéricos, así como cualquier otro órgano que presentara indicios de haber sufrido un proceso tumoral, anotándose la presencia/ausencia de metástasis macroscópicas. Inmediatamente, se centrifugaron las muestras sanguíneas para obtener el plasma y la FCS. Las muestras plasmáticas fueron sometidas a las mismas condiciones de centrifugación que las descritas para las muestras humanas.

En los casos en que no se detectaron macrometástasis pulmonares, hepáticas o de los ganglios mesentéricos, se tomaron muestras para detección de micrometástasis, mediante amplificación de ADN tumoral, siguiendo el mismo procedimiento que el descrito para las muestras humanas. También se realizaron estudios anatomopatológicos de los tumores, se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) y se examinaron mediante microscopía con un microscopio óptico multicabezal Olympus BHd (Hicksville, Nueva York, EE.UU.).

6.1 Detección de secuencias mutadas y no mutadas de *K-ras* humano en tejidos murinos.

Se analizaron las muestras de tumor, hígado, pulmón, plasma y FCS extraídas de los animales (Figura 10).

El tratamiento de las muestras de tumor, hígado y pulmón, así como la extracción de ADN y la detección de mutaciones, se llevó a cabo siguiendo la misma metodología descrita para las muestras humanas de sangre y tejido tumoral.

Las muestras de plasma recibieron el mismo tratamiento que el descrito para las muestras de plasma humano, pero la extracción de ADN se realizó con el “kit” comercial “NucleoSpin Plasma XS” (Macherey-Nagel, Düren, Alemania).

La extracción de ADN de las muestras de FCS se realizó con el “kit” comercial “QIAamp DNA Blood Mini kit” (Qiagen).

La detección de secuencias mutadas y no mutadas de *K-ras* humano, se realizó del mismo modo descrito para las muestras de tejidos y plasmas humanos.

6.2 Detección de secuencias mutadas y no mutadas de k-ras murino en tejidos de ratón.

Se analizaron las muestras de tumor, hígado, pulmón y FCS extraídas de los animales (Figura 10).

Todas las muestras se trataron según lo expuesto en el apartado anterior (6.1) y la detección de secuencias mutadas y no mutadas de k-ras murino se realizó mediante la técnica MASA descrita en el apartado 5.5.2.

7. Esquema general de la parte principal de los experimentos.

A continuación se resume, de manera esquemática, el diseño de los tres bloques principales de experimentos realizados en el trabajo desarrollados anteriormente en los distintos apartados.

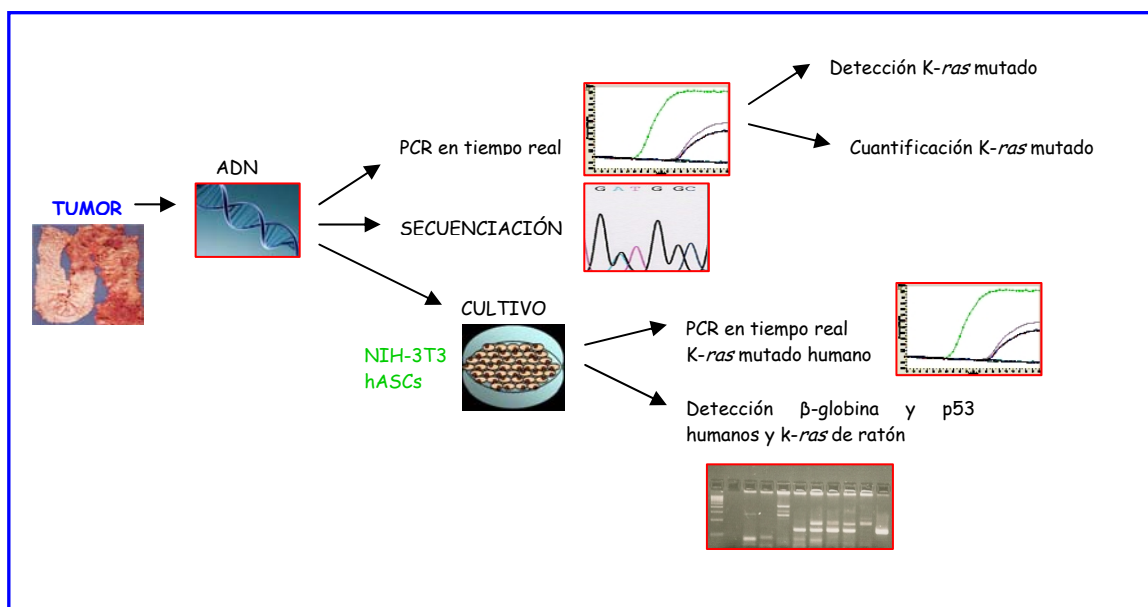


Figura 9. Representación esquemática del cultivo de células hASCs y NIH-3T3 con ADN libre extraído de tumores de pacientes con CCR, y de la detección de secuencias humanas y de ratón.

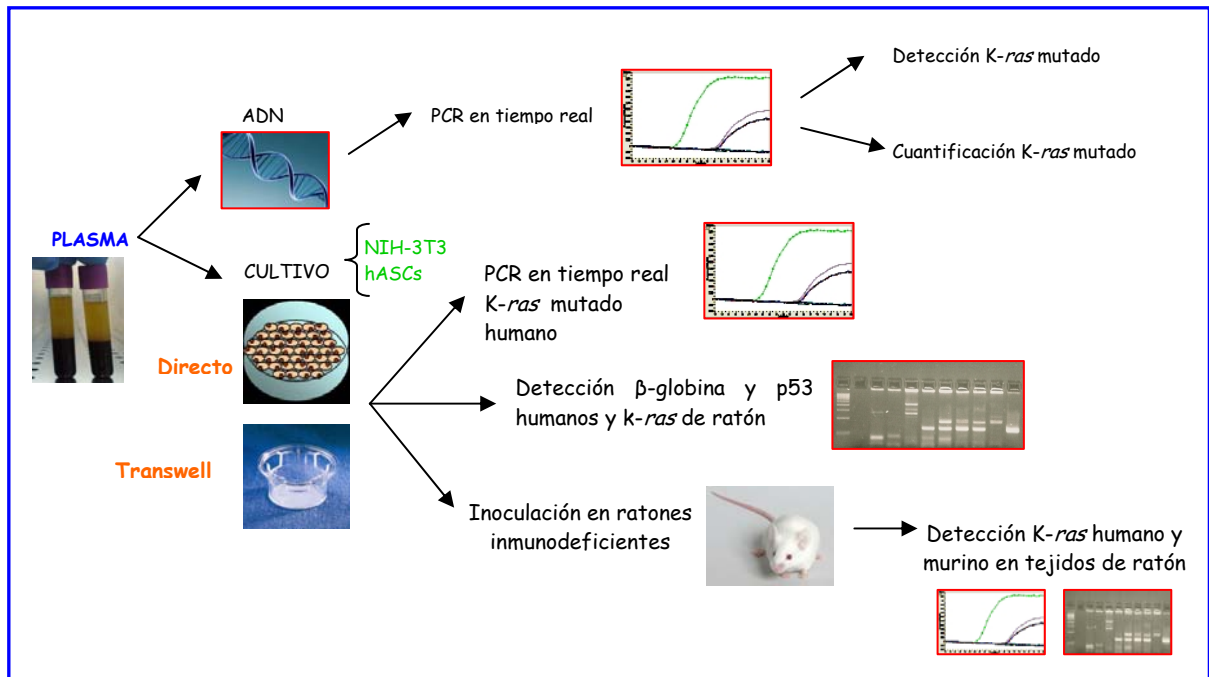


Figura 10. Representación esquemática del cultivo de células hASCs y NIH-3T3 con plasmas de pacientes con CCR, y de la detección de secuencias humanas y de ratón.

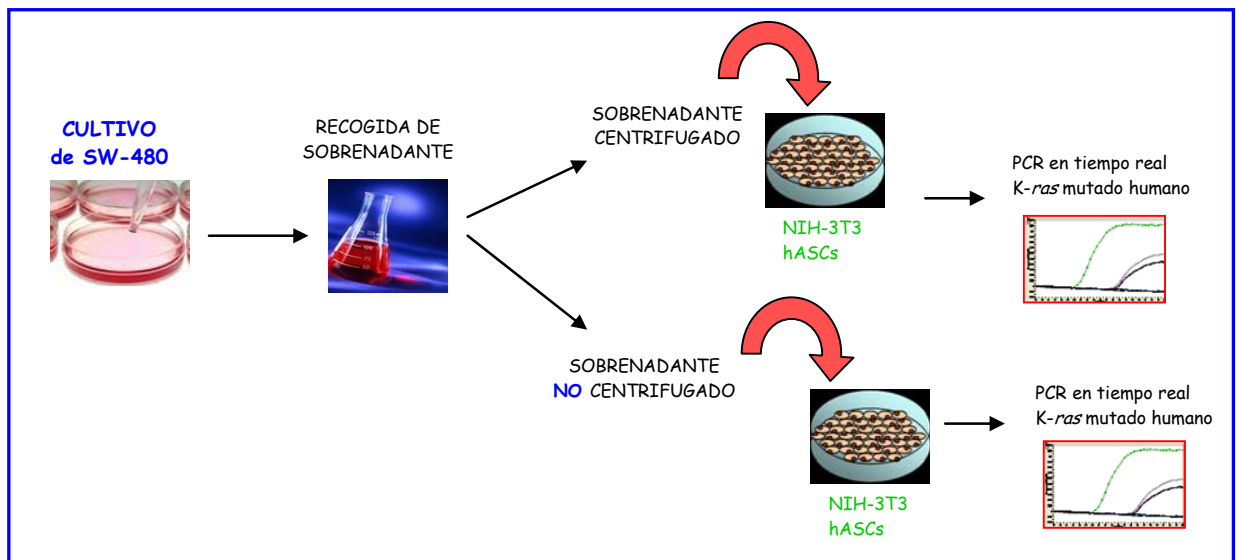


Figura 11. Representación esquemática del cultivo de células hASCs y NIH-3T3 con sobrenadante de cultivos de células SW-480, y de la detección de secuencias humanas.

RESULTADOS

Resultados

1. Resultados de la cuantificación por espectrofotometría en muestras de tumores y plasmas de pacientes con CCR.

La cantidad ADN extraído de los tumores primarios de pacientes con CCR osciló entre 32 ng/μl y 812 ng/μl (142 ± 145 ng/μl; media \pm de) y la de los plasmas de pacientes estuvo comprendida entre 1 ng/μl y 11 ng/μl ($3,3 \pm 2,3$ ng/μl).

2. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de K-ras en muestras de tumores colorrectales.

2.1. Secuenciación de tumores.

A lo largo de todo el estudio se reclutaron 252 pacientes con CCR. Se secuenció el exón 1 de K-ras de los tumores de los pacientes. Los resultados de la secuenciación se muestran en la Tabla 8. Del total se seleccionaron aquellos pacientes de los que fue posible obtener muestras de sangre, tejido tumoral y tejido normal para realizar los experimentos.

Número total de tumores analizados	252
Nº de tumores con K-ras mutado (total)	62 (24,6 %)
Nº de tumores con mutación Gly12Asp (GAT)	35 (56,5 %)
Nº de tumores con mutación Gly12Cys (TGT)	6 (9,7 %)
Nº de tumores con mutación Gly12Val (GTT)	10 (16,1 %)
Nº de tumores con mutación Gly12Ser (AGT)	6 (11,5 %)
Nº de tumores con mutación Gly12Ala (GCT)	5 (8 %)
Nº de tumores sin mutación en K-ras	190 (75,4 %)

Tabla 8. Número total tumores colorrectales primarios en los que se secuenció el exón 1 del gen K-ras.

2.2. Puesta a punto de la técnica de PCR en tiempo real para la detección de mutaciones de K-ras.

Se probaron diversas concentraciones de cebadores, sondas FRET y sonda PNA en la mezcla de reacción, hasta conseguir una especificidad del 100% en la detección de secuencias mutadas del gen K-ras. Es decir, hasta que se inhibió por completo la amplificación del ADN no mutado.

En ausencia de sonda PNA se observó amplificación, tanto en el ADN extraído de las muestras de tumor, como en los controles de ADN no tumoral (Figura 12A); mientras que, cuando se añadió a la mezcla de reacción sonda PNA, a una concentración de 2 μM, se obtuvo amplificación sólo en las muestras que portaban mutación (Figura 12B). La amplificación con

concentraciones menores de sonda PNA (1 y 1,5 μM) no consiguieron la inhibición total de la amplificación del ADN no mutado, dando lugar, por tanto, a falsos positivos.

Con estas condiciones se realizó satisfactoriamente la detección de secuencias mutadas y no mutadas de *K-ras* humano, tanto en muestras de ADN extraídas de tejido tumoral (Figura 12), como en las extraídas de plasma (Figura 13), así como en las células hASCs y NIH-3T3 cultivadas con ADN tumoral, o con plasmas de pacientes con CCR.

Las secuencias de *K-ras* mutado, detectadas en las muestras de tumores, fueron confirmadas por secuenciación y, por tanto, los resultados fueron los mismos que los mostrados en la tabla anterior (Tabla 8).

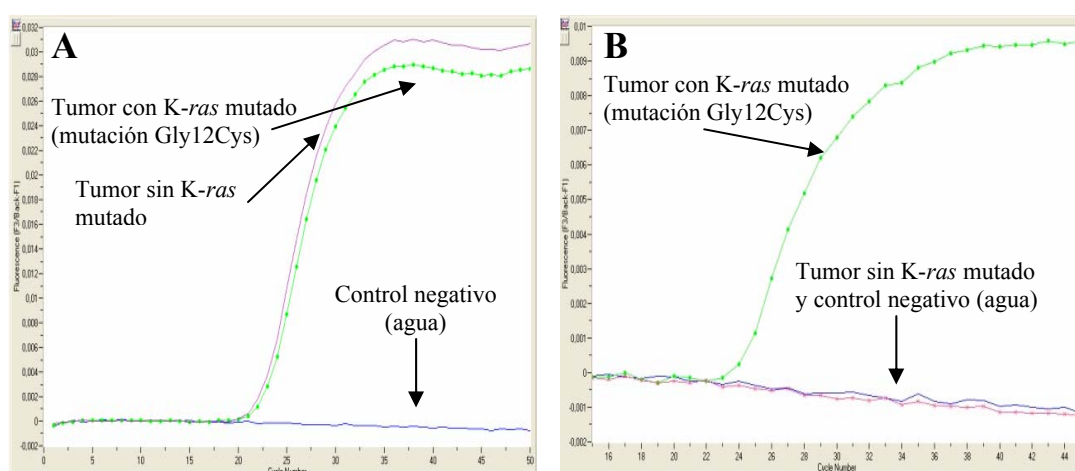


Figura 12. Gráfica de la amplificación por PCR en tiempo real de dos muestras de ADN extraído de tumores, con y sin *K-ras* mutado, respectivamente. (A) PCR realizada sin sonda PNA. (B) PCR realizada con sonda PNA. Se utilizó la sonda “sensor”-TGT en ambos casos.

2.3. Resultado de las pruebas de sensibilidad del método de PCR en tiempo real para la detección de mutaciones de *K-ras*.

Las pruebas de sensibilidad realizadas, mostraron que, con esta técnica, se pudo detectar ADN tumoral, como mínimo, en un exceso de mil veces más de ADN no tumoral (dilución 1:1000).

3. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de *K-ras* en plasmas.

Para las muestras de ADN plasmático se pusieron tres réplicas por muestra, para asegurar que si había *K-ras* mutado sería detectado, ya que la cantidad de secuencias mutadas de *K-ras* con respecto a las no mutadas en estas muestras, es considerablemente más pequeña y, por tanto, menor la probabilidad de que se den las condiciones para que amplifique. Se consideró el resultado positivo si una de las tres réplicas amplificaba (Figura 13).

En el 81% de los plasmas extraídos de los pacientes cuyos tumores primarios tuvieron *K-ras* mutado, se detectaron secuencias mutadas.

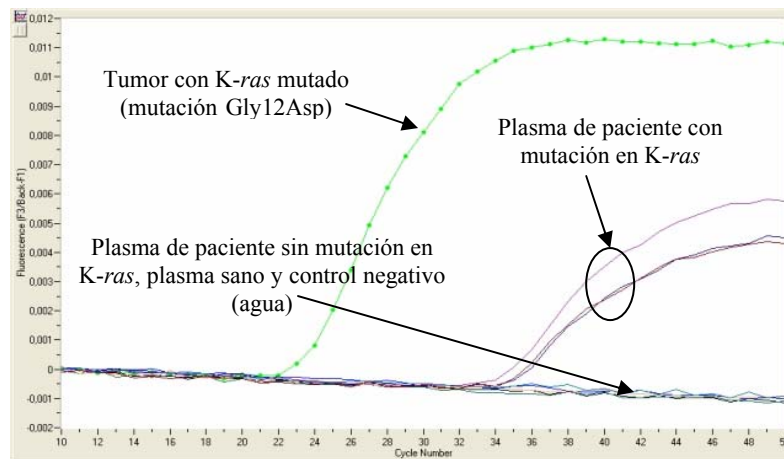


Figura 13. Gráfica de la amplificación por PCR en tiempo real de dos muestras de ADN extraído de dos plasmas de pacientes con y sin K-ras mutado. Se empleó sonda PNA y sonda “sensor”-GAT. Se pusieron tres réplicas por muestra. Se detectó ADN mutado en uno de los plasmas y las 3 réplicas fueron positivas.

4. Cultivo de células hASCs y NIH-3T3 con ADN libre extraído de tumores colorrectales.

4.1. Resultados morfológicos: estudio microscópico.

En las células hASCs cultivadas con ADN procedente de tumores colorrectales primarios mediante el “procedimiento 1”, no se observaron cambios morfológicos durante el mes que duró el experimento (Figura 14E y F). Sin embargo, el cultivo de células NIH-3T3 con este ADN, originó focos macroscópicos de crecimiento celular, que se empezaron a apreciar a partir de los 15-20 días (Figura 15G, H e I). No se observaron cambios morfológicos en las células cultivadas con ADN de FCS, ni en los cultivos control de células con su medio de cultivo habitual (Figuras 14A-D y 15A-F).

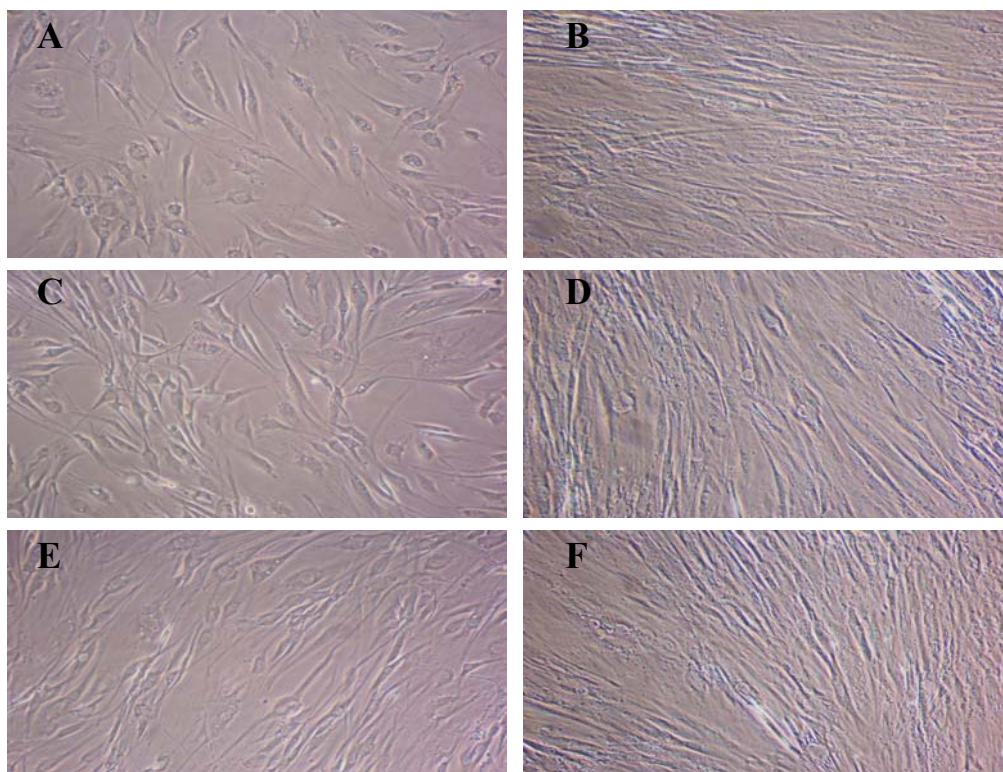


Figura 14. Fotografías de cultivos de células hASCs. Microscopía óptica de contraste de fases. **A y B:** cultivos control, días 1 y 30; **C y D:** células cultivadas con ADN de FCS, días 1 y 30; **E y F:** células cultivadas con ADN tumoral con mutación Gly12Asp, días 1 y 30.

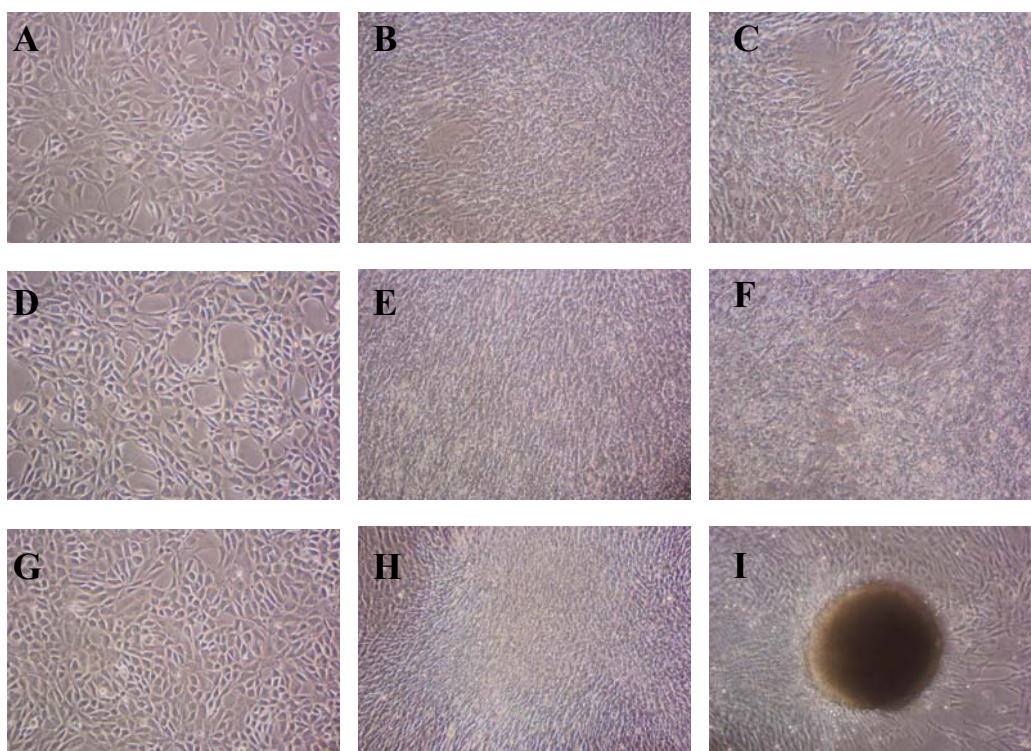


Figura 15. Fotografías de cultivos de células NIH-3T3. Microscopía óptica de contraste de fases. **A, B y C:** cultivos control, días 1, 10 y 30; **D, E y F:** células transfectadas con ADN de FCS, días 1, 10 y 30; **G, H e I:** células transfectadas con ADN tumoral con mutación Gly12Asp, días 1, 10 y 30.

Los resultados obtenidos con el “procedimiento 2” (disgregación periódica de las células) coincidieron básicamente con los anteriores, a excepción de que en los cultivos de las células NIH-3T3 transfectadas con ADN tumoral, no aparecieron focos macroscópicos de crecimiento celular debido, probablemente, a la disgregación a la que se sometían. No se observaron cambios en la morfología celular en ninguna de las condiciones experimentales de ninguno de las dos líneas celulares (hASCs y NIH-3T3).

4.2. Cuantificación de ADN mutado en las muestras de plasmas y tejidos tumorales.

Todas las muestras de tejidos y plasmas de los pacientes con CCR utilizadas para el cultivo de las células hASCs y NIH-3T3, fueron positivas para la detección de secuencias mutadas del gen *K-ras* (mutación Gly12Asp).

Se cuantificó el ADN mutado que había en los plasmas, por ml de muestra, y las cantidades oscilaron entre $0,7 \times 10^{-3}$ y $5,5 \times 10^{-3}$ pg/ml ($2,3 \times 10^{-3} \pm 1,5 \times 10^{-3}$ pg/ml).

Cuando se realizaron los cultivos celulares con los plasmas, la cantidad que se añadió a las células fue de 1,5 ml; por tanto, la cantidad de secuencias mutadas osciló entre $1,05 \times 10^{-3}$ y $8,25 \times 10^{-3}$ pg ($3,5 \times 10^{-3} \pm 2,3 \times 10^{-3}$ pg).

También se cuantificaron las secuencias mutadas que había en el ADN tumoral utilizado para las transfecciones, y las cantidades oscilaron entre 0,8 y 4,7 pg ($3,05 \pm 1,93$ pg; media \pm d.e).

Por tanto, la cantidad de secuencias mutadas encontradas en las muestras de tejido fue de aproximadamente tres órdenes de magnitud mayor que en el caso de los plasmas. Aplicando el test t de Student, se confirmó que la diferencia entre las medias era estadísticamente significativa ($p = 0,0014$).

4.3. Análisis molecular de los cultivos.

4.3.1. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de *K-ras* humano.

En las células NIH-3T3 transfectadas con ADN mutado y cultivadas mediante el “procedimiento 1”, se pudieron detectar secuencias mutadas de *K-ras* humano al finalizar el ensayo (Figura 16A) en los 5 cultivos con ADN con mutación Gly12Asp y en 2 de los 5 con ADN con mutación Gly12Val. Respecto a los 3 cultivos restantes con ADN con mutación Gly12Val, en 1 de ellos no se detectó la mutación y en los otros 2 las células murieron antes de finalizar el experimento.

Se encontraron secuencias no mutadas de *K-ras* en 2 de los 5 cultivos realizados con ADN de FCS, y el análisis de los 5 cultivos con ADN de tejidos tumorales sin mutación en *K-ras* reveló la presencia de secuencias no mutadas.

Por otro lado, en las células hASCs, no se detectaron secuencias mutadas de K-*ras* en ninguno de los 5 cultivos realizados con ADN con mutación Gly12Asp ni en los 5 con mutación Gly12Val (Figura 16B).

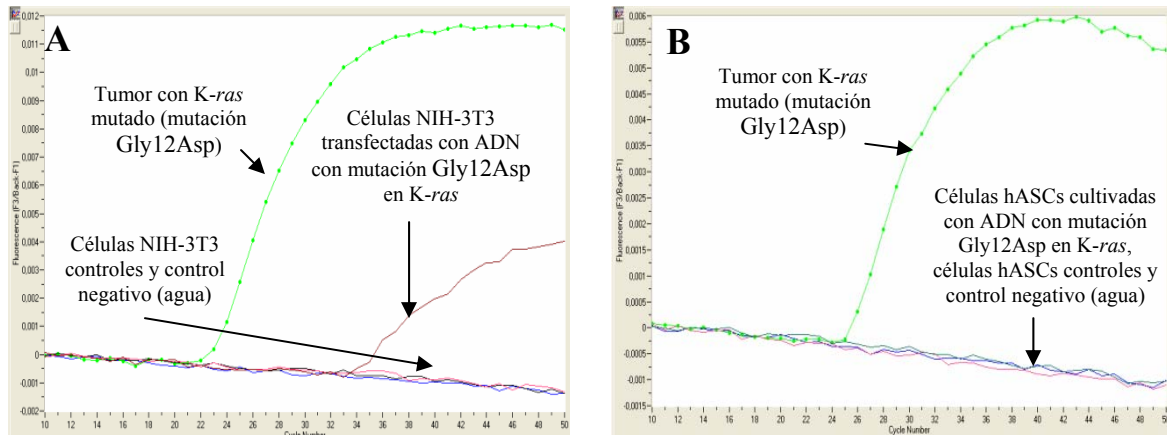


Figura 16. Gráfica de la amplificación por PCR en tiempo real de ADN extraído de células NIH-3T3 y células hASCs cultivadas con ADN libre y con mutación Gly12Asp en K-*ras* mediante el “procedimiento 1”. **A:** células NIH-3T3; **B:** células hASCs. Para la amplificación se utilizó la sonda “sensor”- GAT y sonda PNA.

Los resultados obtenidos con el “procedimiento 2” (disgregación periódica de las células) coincidieron básicamente con los anteriores. Las células NIH-3T3, incorporaron la secuencia mutada del gen K-*ras* humano cuando se transfectaron con ADN tumoral con mutación Gly12Asp, Gly12Val y Gly12Cys y la mantuvieron durante todo el ensayo hasta completar el mes de cultivo. No se detectó K-*ras* mutado ni en las células transfectadas con ADN de FCS ni en las cultivadas con medio de cultivo habitual (Figura 17A). Por otro lado, en el mismo ensayo realizado con células hASCs, no se detectó K-*ras* mutado ni en las células cultivadas con ADN tumoral, ni con ADN de FCS, ni en las células control (Figura 17B). A su vez, en las células NIH-3T3 transfectadas con ADN no tumoral se detectaron secuencias no mutadas del gen K-*ras* humano (Figura 18).

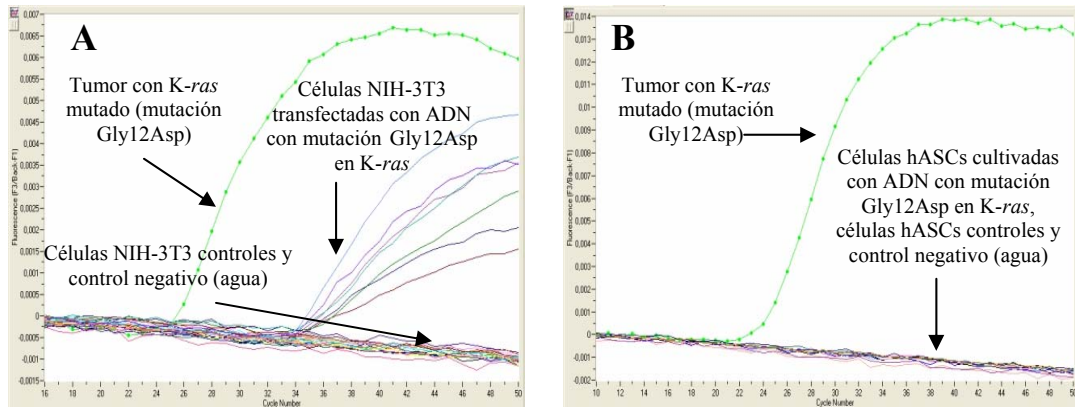


Figura 17. Gráfica de la amplificación por PCR en tiempo real de ADN extraído de células NIH-3T3 transfectadas y células hASCs cultivadas con ADN libre y con mutación Gly12Asp en K-ras mediante el “procedimiento 2”. **A:** células NIH-3T3. Se extrajo y analizó el ADN en siete pases consecutivos. **B:** células hASCs. Para la amplificación se utilizó la sonda “sensor”- GAT y sonda PNA.

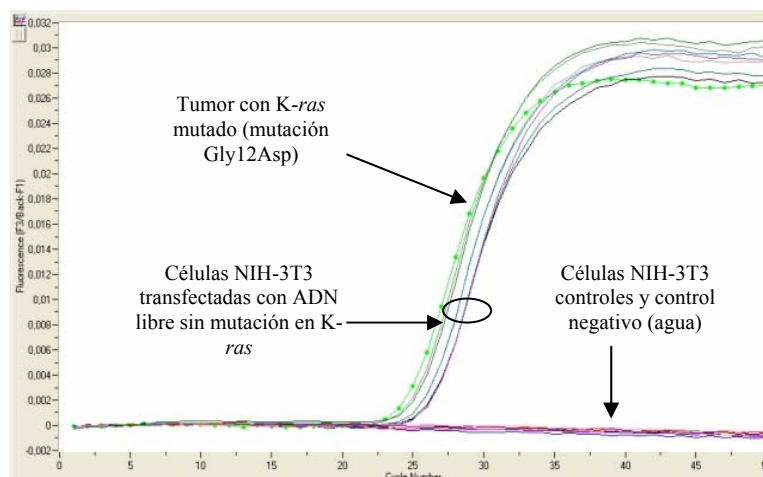


Figura 18. Gráfica de la amplificación por PCR en tiempo real de ADN extraído de células NIH-3T3 transfectadas con ADN libre no mutado. Se utilizó la sonda “sensor”-GAT y no se empleó sonda PNA.

4.3.2. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de k-ras murino.

Una vez comprobado que las células NIH-3T3 eran capaces de incorporar secuencias mutadas y no mutadas del gen K-ras humano, se analizó si tenían mutado su propio gen k-ras (murino). Concretamente se analizó la mutación Gly12Asp. Para ello se utilizó la técnica MASA descrita en el punto 5.5.2 del apartado de materiales y métodos. Los resultados fueron los mismos para las células cultivadas con el “procedimiento 1” y con el “procedimiento 2”. En ninguno de los 6 experimentos se encontró la secuencia mutada del gen k-ras (Figura 19), mientras que la secuencia no mutada se encontró sólo en 4 de los casos, debido, posiblemente, a la degradación del ADN de estas dos muestras.

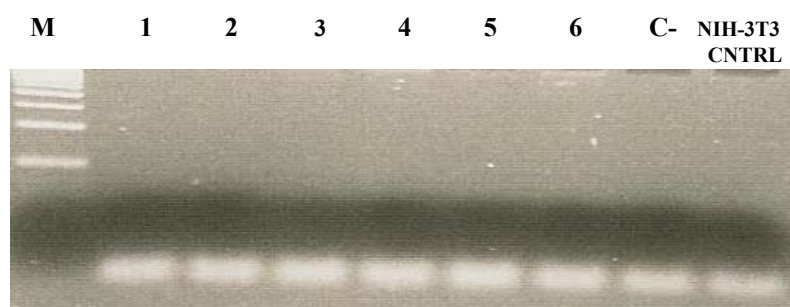


Figura 19. Análisis MASA para la amplificación de la mutación Gly12Asp del gen *k-ras* murino de ADN extraído de células NIH-3T3 transfectadas con ADN libre tumoral. M: marcador de peso molecular. Carriles 2 a 7: amplificación de ADN mutado en *k-ras*. Carril 8: control negativo (agua). Carril 9: ADN de células NIH-3T3 sin tratamiento.

4.3.3. Detección de p53 humano.

Se quiso comprobar si las células NIH-3T3 habían incorporado alguno de los alelos del gen p53 humano que codifican para el polimorfismo ARG/PRO. De los 6 cultivos realizados (cinco con el “procedimiento 1” y uno con el “procedimiento 2”), las células incorporaron el alelo ARG en 2 de los cultivos y el alelo PRO en ninguno de los casos.

4.3.4. Detección de β -globina humana.

Por último, se quiso verificar si las células NIH-3T3 habían incorporado la secuencia que codifica para el gen de la β -globina humana. De los 6 cultivos realizados, las células cultivadas mediante el “procedimiento 1” incorporaron la secuencia en 1 de los casos y las cultivadas mediante el “procedimiento 2” también.

Los casos en los que las células NIH-3T3 incorporaron el mencionado alelo ARG del gen p53, incorporaron también la secuencia que codifica la β -globina y a la inversa, cuando no incorporaron el alelo ARG tampoco incorporaron la secuencia para β -globina.

5. Cultivo de células hASCs y NIH-3T3 con plasmas de pacientes con CCR.

5.1. Cultivo con plasmas (adición directa).

5.1.1. Resultados morfológicos: estudio microscópico.

Durante los diez días que las células hASCs estuvieron incluidas en la matriz de fibrina, presentaron una morfología diferente respecto a las células de los cultivos control (sin adición de plasma). Este aspecto peculiar (compactación del citoplasma y emisión de prolongaciones;

Figuras 20D, E, G y H) fue debido, probablemente, a su crecimiento en la matriz tridimensional generada por la adición de plasma más el suplemento de cloruro cálcico. Por el contrario, las células NIH-3T3, creciendo en las mismas condiciones, no perdieron su morfología habitual (Figuras 21D, E, G y H).

Al liberar las células de la matriz tras los diez días de cultivo y sembrarlas de nuevo en placas, las células hASCs recuperaron su morfología y no se apreció ningún cambio con respecto a las células control hasta el final del experimento (Figuras 20C, F e I). Las células NIH-3T3 conservaron su morfología en el mes de experimento (Figura 21C, F e I).

No se encontraron diferencias morfológicas entre las células hASCs o NIH-3T3 cultivadas con plasma de voluntarios sanos y las cultivadas con el plasma de pacientes (Figuras 20F e I y 21F e I).

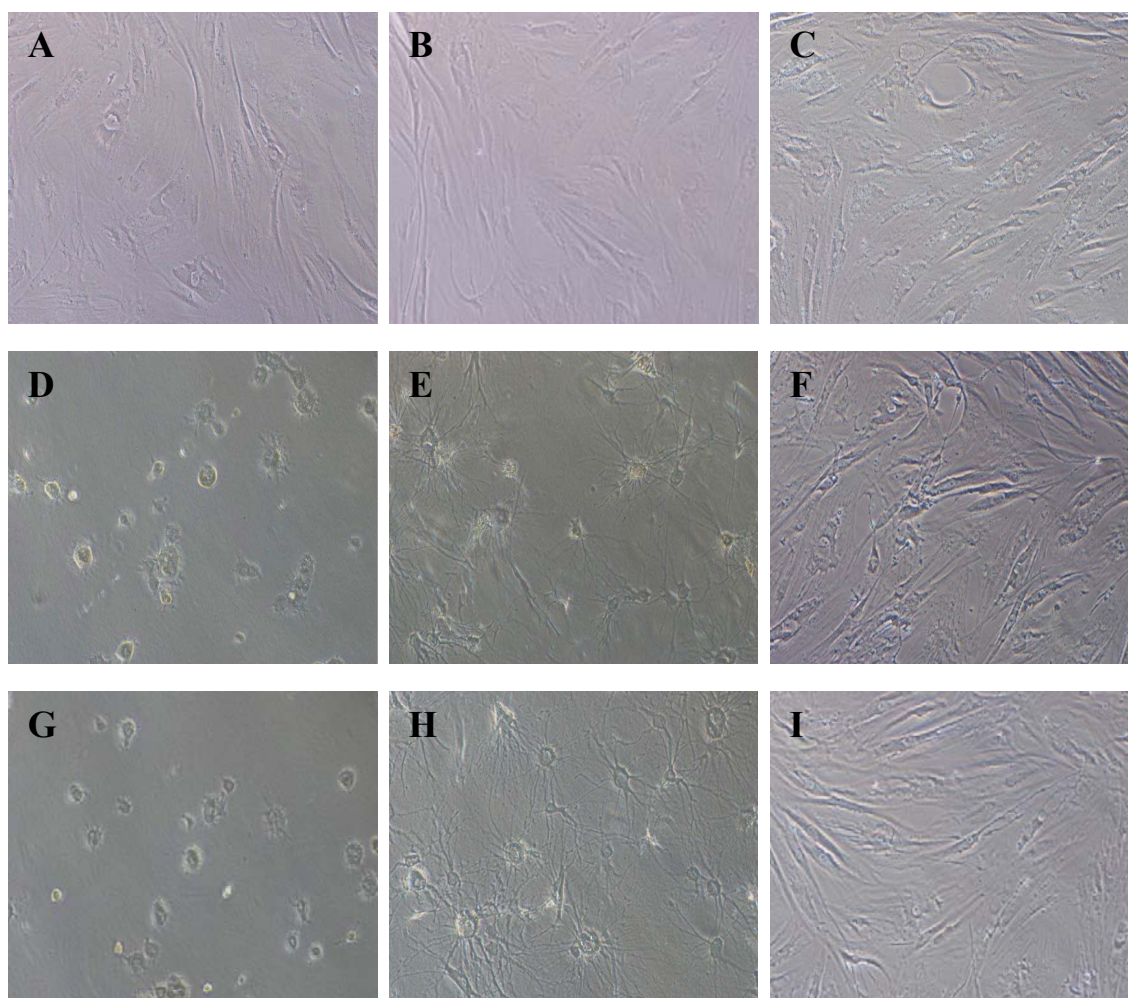


Figura 20. Fotografía de las células hASCs cultivadas con los plasmas de pacientes con CCR. Microscopía óptica de contraste de fases. **A, B y C:** cultivos control, días 1, 10 y 30; **D, E y F:** células cultivadas con el plasma de un voluntario sano, días 1, 10 y 30; **G, H e I:** células cultivadas con el plasma (mutación Gly12Asp) de un paciente con CCR, días 1, 10 y 30.

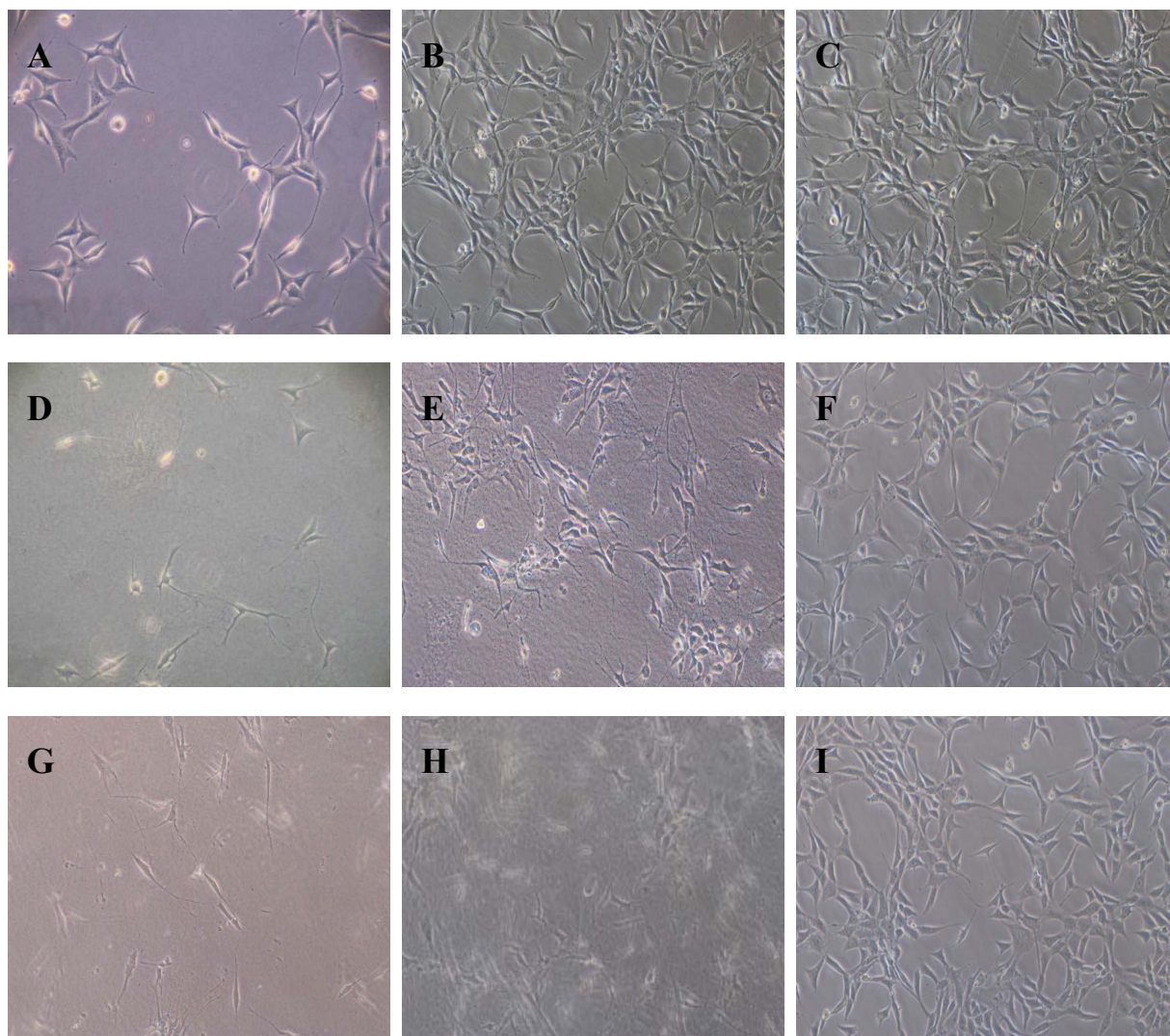


Figura 21. Fotografía de las células NIH-3T3 cultivadas con los plasmas de pacientes con CCR. Microscopía óptica de contraste de fases. **A, B y C:** cultivos control, días 1, 10 y 30; **D, E y F:** células cultivadas con el plasma de un voluntario sano, días 1, 10 y 30; **G, H e I:** células cultivadas con el plasma (mutación Gly12Asp) de un paciente con CCR, días 1, 10 y 30.

5.1.2. Análisis molecular de los cultivos.

5.1.2.1. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de K-ras humano.

En las células hASCs cultivadas con los plasmas de pacientes, no se detectaron secuencias mutadas de K-ras mediante PCR en tiempo real en ninguno de los 12 cultivos (Figura 22B). Por el contrario, en 7 de los 12 cultivos de células NIH-3T3, se detectaron secuencias mutadas en todos los pases desde el principio hasta el final del experimento (Figura 22A). En otros 4, el ADN mutado fue detectado de manera intermitente y en 1, las células murieron antes de realizar el primer pase. Se repitió este último cultivo obteniendo el mismo resultado. Las células NIH-3T3 cultivadas con el plasma de voluntarios sanos fueron positivas,

en todos los casos, para secuencias no mutadas de *K-ras* humano (Figura 23) y negativas para secuencias mutadas de *K-ras* (Figura 22A).

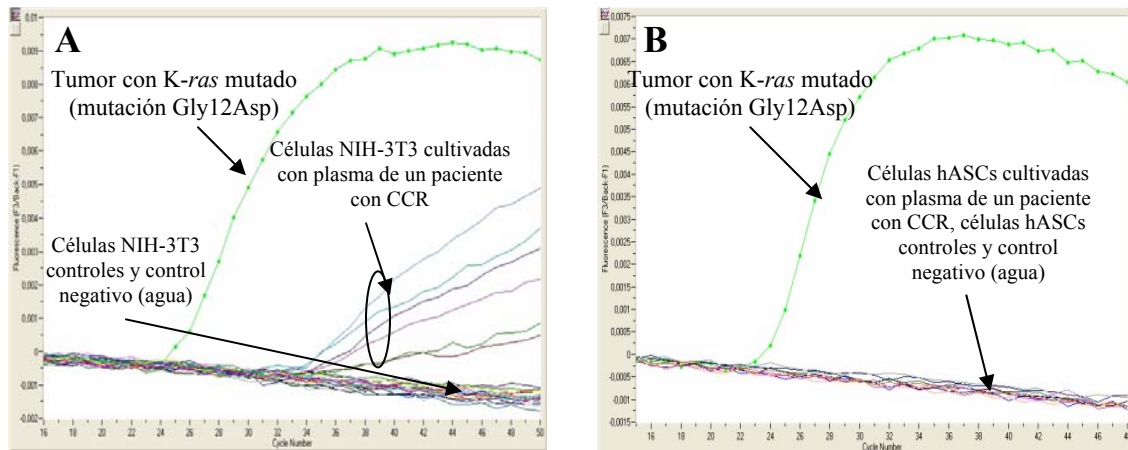


Figura 22. Gráfica de la amplificación por PCR en tiempo real del ADN extraído de células NIH-3T3 y hASCs cultivadas con el plasma de un paciente con mutación en *K-ras* y con el plasma de un voluntario sano. A: células NIH-3T3. Se extrajo y analizó el ADN en seis pases consecutivos; B: células hASCs. Para la amplificación se utilizó la sonda “sensor”- GAT y sonda PNA.

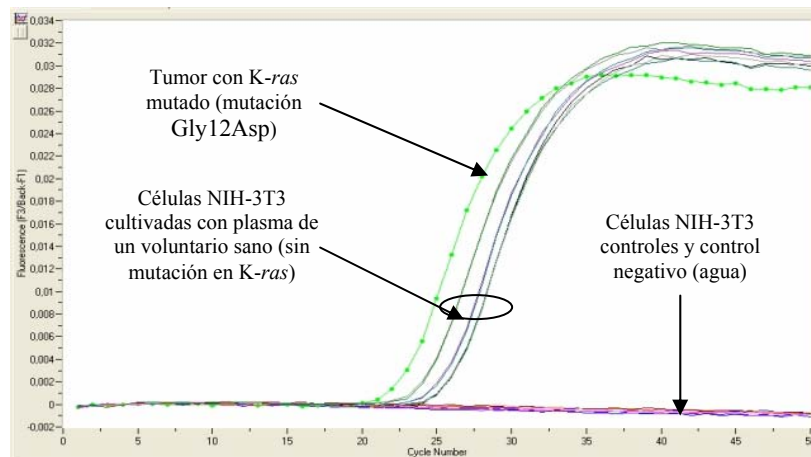


Figura 23. Gráfica de la amplificación por PCR en tiempo real del ADN extraído de células NIH-3T3 cultivadas con el plasma de un voluntario sano. Se utilizó la sonda “sensor”- GAT y no se empleó sonda PNA.

5.1.2.2. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de *k-ras* murino.

Una vez comprobado que las células NIH-3T3 eran capaces de incorporar secuencias mutadas y no mutadas de *K-ras* humano, se analizó si estas mismas células tenían mutado su gen *k-ras* (murino). Concretamente se analizó la mutación Gly12Asp y para ello se utilizó la técnica MASA descrita en el punto 5.5.2 del apartado de materiales y métodos. El resultado fue que no se detectó *k-ras* mutado en ninguno de los cultivos, mientras que la secuencia no mutada se encontró en el 100% de los casos analizados.

5.1.2.3. Detección de p53 humano.

Al igual que con las células NIH-3T3 transfectadas con ADN tumoral, se quiso comprobar si estas mismas células, ahora cultivadas con los plasmas de pacientes de CCR, habían incorporado alguno de los alelos del gen p53 humano que codifican para el polimorfismo ARG/PRO (Figura 24). Las células incorporaron el alelo ARG en 6 de 8 cultivos, 3 de los cuales también incorporaron la secuencia que codifica PRO.

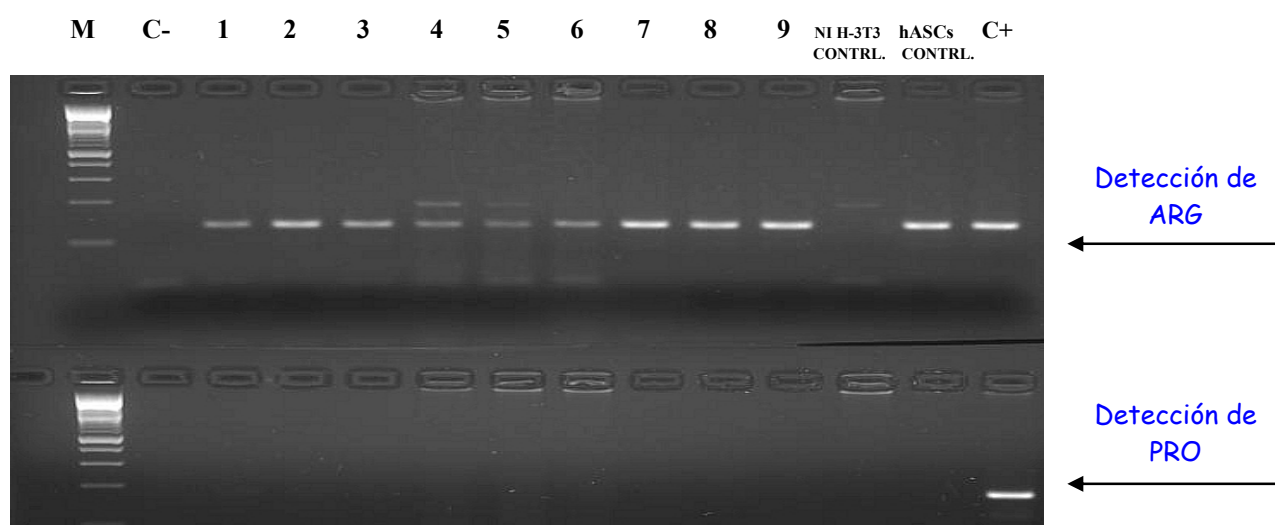


Figura 24. Detección de secuencias de p53 humano por PCR en ADN de células NIH-3T3 y hASCs cultivadas con los plasmas de 3 pacientes. M: marcador de peso molecular. Carril 2: control negativo (agua); Carriles 3 a 5: amplificación de ADN de plasma de 3 pacientes; carriles 6 a 8: amplificación de ADN de células NIH-3T3 cultivadas con el plasma de los mismos 3 pacientes; carriles 9 a 11: amplificación de ADN de células hASCs cultivadas con el plasma de los 3 pacientes; carril 12: células NIH-3T3 control; carril 13: células hASCs control; carril 14: control positivo (ADN humano normal).

Se quiso comprobar si las células hASCs del donante sin patología tumoral, utilizadas en el estudio, eran homocigotas o heterocigotas para el polimorfismo de p53. Resultaron ser homocigotas ARG/ARG. También se comprobó el polimorfismo de los plasmas con los que habían sido cultivadas estas células. Tres de los plasmas analizados fueron heterocigotos ARG/PRO. Con estos dos resultados, se quiso comprobar si las células hASCs cultivadas con estos 3 plasmas, habían incorporado el alelo PRO. El resultado fue negativo en los 3 cultivos analizados, de tal manera que las células hASCs no fueron capaces de captar la secuencia de p53 presente en los plasmas.

5.1.2.4. Detección de β -globina humana.

Por último, se quiso comprobar si las células NIH-3T3 habían incorporado la secuencia que codifica para el gen de la β -globina humana (figura 25). De los 8 cultivos analizados, en 6 de ellos se encontró dicha secuencia.

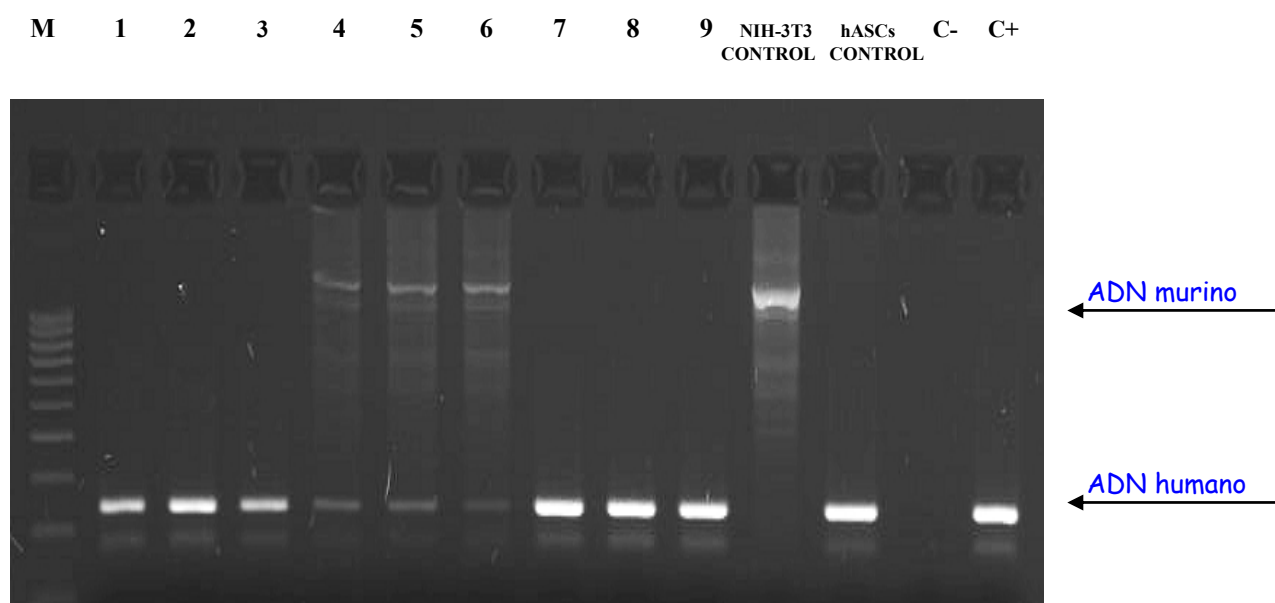


Figura 25. Detección de secuencias de β -globina humana por PCR en ADN de células NIH-3T3 y hASCs cultivadas con los plasmas de pacientes. M: marcador de peso molecular. Carriles 2 a 4: amplificación de ADN de plasma de 3 pacientes; carriles 5 a 7: amplificación de ADN de células NIH-3T3 cultivadas con el plasma de los mismos 3 pacientes; carriles 8 a 10: amplificación de ADN de células hASCs cultivadas con el plasma de los 3 pacientes; carril 11: células NIH-3T3 control; carril 12: células hASCs control; carril 13: control negativo (agua); carril 14: control positivo (ADN humano normal).

Los casos en los que las células NIH-3T3 incorporaron secuencias de p53, incorporaron también la secuencia que codifica para gen de la β -globina y a la inversa, cuando no incorporaron ARG tampoco incorporaron β -globina, excepto en 1 cultivo en el que las células incorporaron el gen de la β -globina humana pero no incorporaron la secuencia ARG.

5.2. Cultivo en placas con membrana (sistema Transwell®).

5.2.1. Resultados morfológicos: estudio microscópico.

Previo a la realización de los cultivos con el plasma de los pacientes, se fijaron células NIH-3T3 sobre la superficie de las membranas (Transwell®), para comparar el tamaño celular con el tamaño de los poros de las mismas. Se realizaron estudios de microscopía óptica (cortes semifinos) y microscopía electrónica (cortes ultrafinos) y se observó que el tamaño de las células era de unas 20 μm , lo que suponía que era 50 veces superior al tamaño de poro de la membrana (0,4 μm); (Figura 26 A y B).

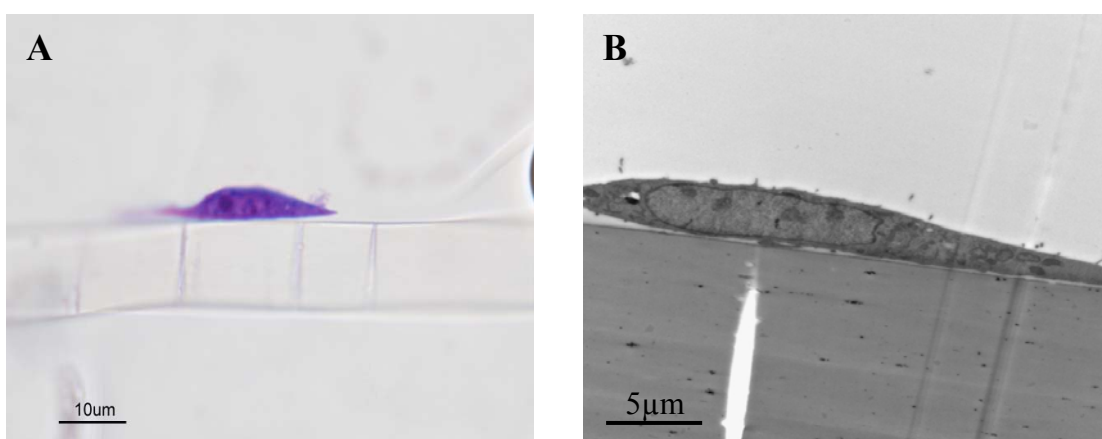


Figura 26. Micrografías de microscopía óptica y electrónica de células NIH-3T3 fijadas en la parte superior de la membrana de los Transwell® de 0,4 μm de diámetro de poro. **A:** cortes transversales semifinos para microscopía óptica; células teñidas con azul de toluidina. **B:** cortes transversales ultrafinos para microscopía electrónica; células teñidas con citrato de plomo.

Cuando se analizaron las membranas que contenían los plasmas de los pacientes, el estudio microscópico mostró la ausencia de células y la presencia de unas estructuras con forma esférica de un tamaño aproximado de 0,2 μm , por tanto inferior al tamaño del poro de las membranas (0,4 μm), que podían circular libremente a través de los poros (Figura 27). Las estructuras se encontraron tanto en el plasma del paciente de cáncer como en el del voluntario sano utilizado como control.

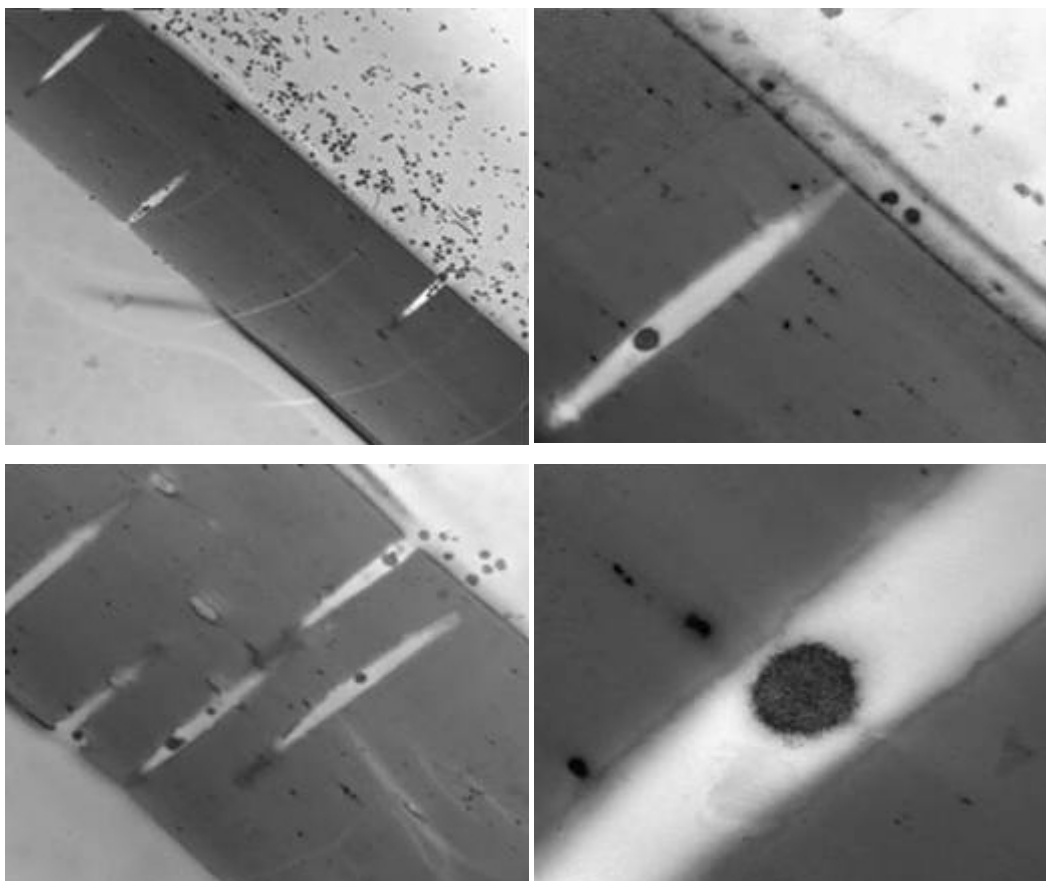


Figura 27. Micrografías electrónicas del inserto de una membrana de un Transwell®. Cortes transversales ultrafinos de una membrana con el plasma de un paciente de CCR fijada para microscopía electrónica. Se observan partículas circulares atravesando los poros de la membrana. A su vez se puede observar ausencia de células.

5.2.2. Análisis molecular de los cultivos.

5.2.2.1. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de K-ras humano.

En las células NIH-3T3 cultivadas con el plasma de un paciente con CCR en el sistema de cultivo en membrana, se detectó la secuencia mutada humana en cada uno de los pases, mientras que no se detectó en los cultivos realizados con el plasma de un voluntario sano (Figura 28A). Las cultivadas con el plasma del voluntario sano fueron positivas para secuencias no mutadas de K-ras humano.

En las células hASCs no se detectaron secuencias mutadas de K-ras humano en ninguno de los pases (Figura 28B).

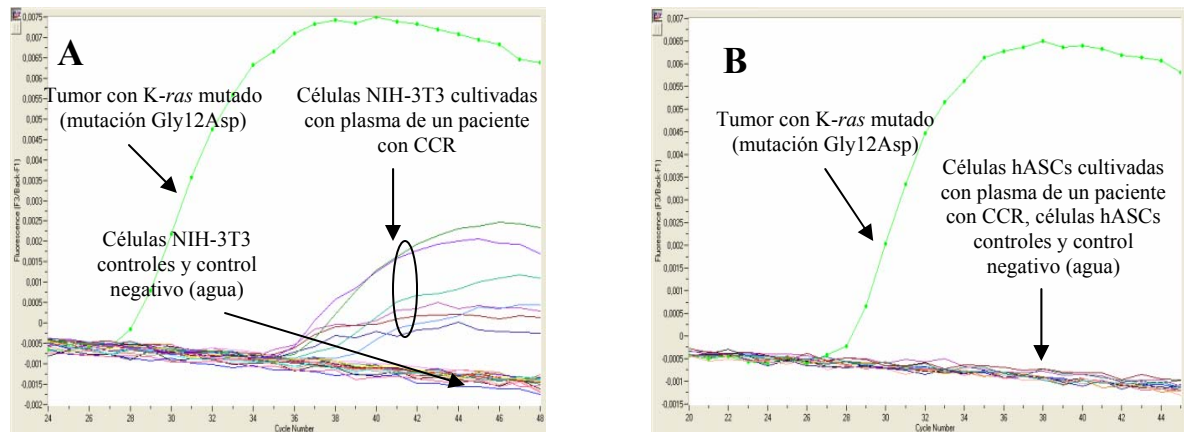


Figura 28. Gráfica de la amplificación por PCR en tiempo real del ADN extraído de células NIH-3T3 y células hASCs cultivadas con un plasma con mutación Gly12Asp en K-ras y un plasma de un voluntario sano en placas con membrana (Transwell®). **A:** células NIH-3T3. **B:** células hASCs. Para la amplificación se utilizó la sonda “sensor”- GAT y sonda PNA.

5.2.2.2. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de k-ras murino.

Al igual que ocurrió con los cultivos directos de las células NIH-3T3 con el plasma de los pacientes, en las células cultivadas en el sistema de placas con membrana no se detectó k-ras mutado murino, mientras que la secuencia no mutada sí se encontró.

5.2.2.3. Detección de p53 humano y β -globina humana.

Las células NIH-3T3, cultivadas en el sistema Transwell® con el plasma de un paciente, no incorporaron secuencias de p53 ni de β -globina.

6. Cultivo de células hASCs y NIH-3T3 con sobrenadante procedente de células SW-480.

6.1. Resultados morfológicos: estudio microscópico.

Ni las células hASCs ni las NIH-3T3 cultivadas con sobrenadante centrifugado o sin centrifugar de células SW-480 mostraron cambios morfológicos (15 días; Figuras 29 y 30). La única diferencia fue que en aquellos cultivos, tanto de células hASCs como NIH-3T3, en los que se empleó sobrenadante sin centrifugar, aparecieron colonias de células SW-480 creciendo en las placas (Figuras 29 D-F y Figuras 30 D-F).

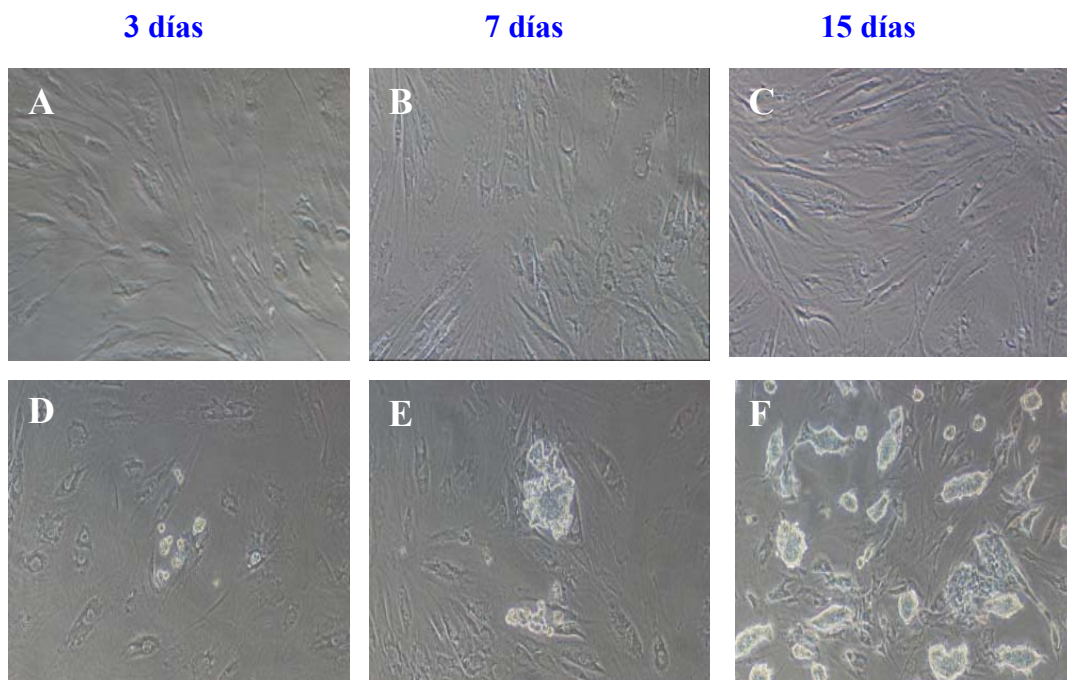


Figura 29. Fotografías de células hASCs cultivadas con el sobrenadante de células SW-480. Microscopía óptica de contraste de fases; **A**, **B** y **C**: cultivos con sobrenadante centrifugado (días 3, 7 y 15 de cultivo); **D**, **E** y **F**: cultivos con sobrenadante sin centrifugar (días 3, 7 y 15 de cultivo).

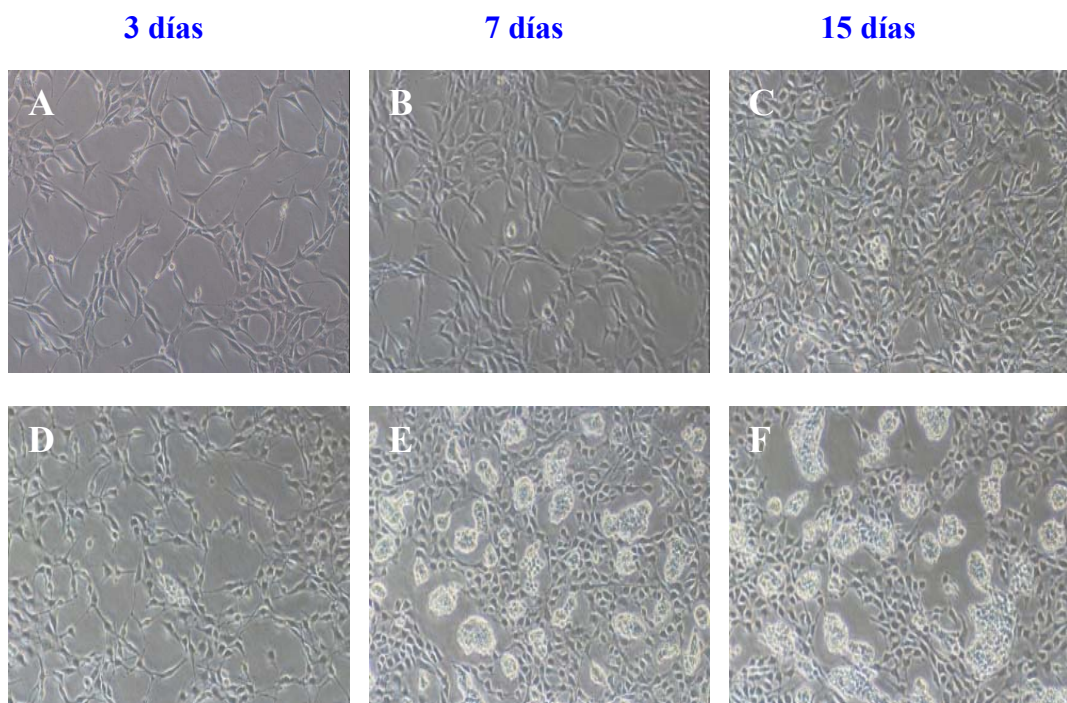


Figura 30. Fotografías de células NIH-3T3 cultivadas con el sobrenadante de células SW-480. Microscopía óptica de contraste de fases; **A**, **B** y **C**: cultivos con sobrenadante centrifugado (días 3, 7 y 15 de cultivo); **D**, **E** y **F**: cultivos con sobrenadante sin centrifugar (días 3, 7 y 15 de cultivo).

6.2. Análisis molecular de los cultivos.

6.2.1. Detección de secuencias mutadas de K-ras humano.

En las células hASCs cultivadas con el sobrenadante centrifugado células SW-480, no se detectaron secuencias mutadas de K-ras humano en los 2 cultivos realizados, mientras que, en las cultivadas con el sobrenadante sin centrifugar se detectó K-ras mutado en todos los casos (la mutación detectada procedía de las células SW-480 que habían formado colonias sobre las hASCs; Figura 31B; Figuras 29D-F). En las células NIH-3T3 se detectaron secuencias mutadas de K-ras humano tanto en las células cultivadas con el sobrenadante centrifugado como en las cultivadas con el sobrenadante sin centrifugar (Figura 31A).

No se detectó mutación en las células control cultivadas con medio de cultivo habitual (Figuras 31A y B).

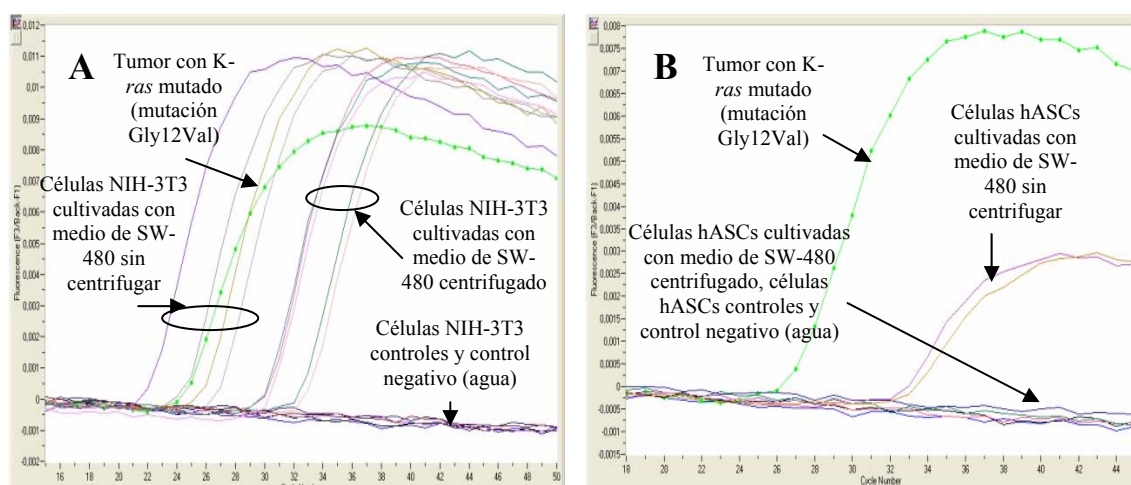


Figura 31. Gráfica de la amplificación por PCR en tiempo real del ADN extraído de células NIH-3T3 y células hASCs cultivadas con sobrenadante de células SW-480 (centrifugado y sin centrifugar). **A:** células NIH-3T3; **B:** células hASCs. Para la amplificación se utilizó la sonda “sensor”- GTT y sonda PNA.

7. Ensayo *in vivo*: inoculación de células hASCs y NIH-3T3 cultivadas con plasmas de pacientes con CCR en ratones inmunodeficientes.

7.1. Evolución clínica de los animales.

Una semana después de la inoculación de las células cultivadas con los plasmas de pacientes con CCR se encontraron masas palpables en los 3 ratones inoculados con células SW-480 y en los 4 inoculados con células NIH-3T3 cultivadas con los plasmas de pacientes (Figura 32A). En el momento del sacrificio, sólo los 7 ratones mencionados tenían masas subcutáneas, con un diámetro final entre 1 y 2,7 cm.

En el resto de condiciones experimentales no se encontraron masas palpables (Figura 32B).

En el caso de los cultivos en el sistema de placas con membrana (Transwell®), se desarrolló un tumor sólo en el ratón inoculado con células NIH-3T3 cultivadas con plasma tumoral. El tumor tuvo un diámetro final de 2,7 cm. Los ratones del resto de condiciones experimentales no desarrollaron tumores.

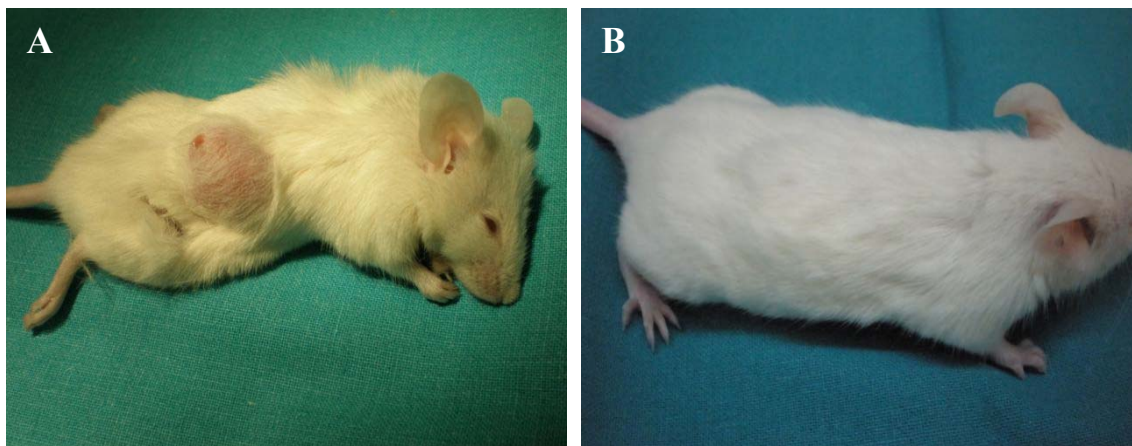


Figura 32. Fotografía de un ratón inoculado con células NIH-3T3 cultivadas con el plasma de un paciente de CCR en la que se puede apreciar el desarrollo de un tumor (A), y un control inoculado con células NIH-3T3 cultivadas con el plasma de un voluntario sano (B). Los ratones fueron sacrificados 36 días después de la inoculación.

7.2. Estudio histológico de las muestras de tejidos.

Una vez realizadas las necropsias, se analizaron las masas tumorales mediante tinción con hematoxilina-eosina. El análisis reveló que los tumores generados por la inoculación de células NIH-3T3 cultivadas con los plasmas de los pacientes, tenían el aspecto de carcinomas indiferenciados (Figura 33). También se examinaron las muestras de hígado, pulmones y ganglios mesentéricos de todos los animales pero no hubo evidencias de tumores macroscópicos ni microscópicos, considerándose las muestras dentro de la normalidad.

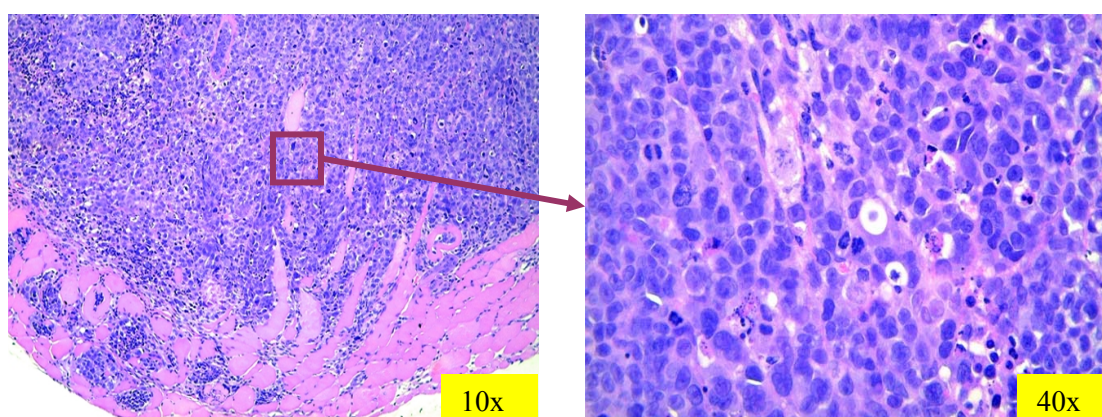


Figura 33. Fotografía de una sección de un tumor generado por la inoculación de células NIH-3T3 cultivadas con el plasma de un paciente de CCR. La sección fue teñida con hematoxilina-eosina y examinada mediante microscopía óptica. La fotografía muestra que el tumor es un carcinoma epitelial en el que regiones indiferenciadas se mezclan con tejido necrótico.

7.3. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de *K-ras* humano.

Cuando se analizó el ADN extraído de los **tumores** de los ratones inoculados con células SW-480 y células NIH-3T3 cultivadas con los plasmas de pacientes, se detectaron secuencias mutadas de *K-ras* humano en todos los casos (Tabla 9).

En el análisis de las muestras de los **plasmas** se detectaron secuencias mutadas de *K-ras* humano en todos los animales inoculados con células SW-480 (Tabla 9) y en 3 de los 4 inoculados con células NIH-3T3 cultivadas con plasmas de pacientes (Tabla 9), no encontrándose secuencias de *K-ras* mutado en ninguna de las muestras de plasma de los ratones inoculados con células hASCs cultivadas con los plasmas de los pacientes (Tabla 9).

El análisis del ADN extraído de las muestras de **FCS** mostró la detección de secuencias mutadas de *K-ras* humano en 1 de los ratones inoculados con células SW-480 (Tabla 9) y en 1 ratón inoculado con células NIH-3T3 cultivadas con el plasma de los pacientes (Tabla 9). También se encontraron estas secuencias en 2 de los ratones inoculados con células hASCs cultivadas con los plasmas de los pacientes (Tabla 9).

El análisis del ADN de las muestras de los **hígados** mostró la detección de secuencias mutadas de *K-ras* humano en todos los ratones inoculados con células SW-480 (Tabla 9), en todos los inoculados con células NIH-3T3 cultivadas con plasmas de pacientes y en 2 de los inoculados con células hASCs cultivadas con los plasmas (Tabla 9). Se repitió la extracción de ADN y los análisis por PCR de las muestras de hígado de estos 2 últimos animales y se obtuvieron los mismos resultados.

El análisis del ADN procedente de las muestras de los **pulmones** mostró la detección de secuencias mutadas de *K-ras* humano en los todos animales inoculados con células SW-480 (Tabla 9) y en todos los animales inoculados con células NIH-3T3 cultivadas con plasmas de pacientes (Tabla 9), no encontrándose estas secuencias en los pulmones de los animales inoculados con células hASCs cultivadas con los plasmas (Tabla 9).

Respecto a las secuencias no mutadas de *K-ras*, se detectaron secuencias de *K-ras* humano en prácticamente todos los tejidos de los animales inoculados con células NIH-3T3 cultivadas con plasmas de pacientes y plasmas sanos, exceptuando aquellos inoculados con células sin tratar

(Tabla 9), mientras que en los animales inoculados con células hASCs se detectaron estas secuencias en menor número de animales (Tabla 9).

Finalmente, en los 2 animales inoculados con células NIH-3T3 cultivadas con el plasma de un paciente con CCR y con el plasma de un voluntario sano, en el sistema de placas con membrana (Transwell®), se detectaron secuencias de *K-ras* humano en tumor, hígado y pulmón y sólo se detectaron secuencias de *K-ras* mutado en las muestras de tumor, hígado y pulmón del ratón inoculado con células NIH-3T3 previamente cultivadas con el plasma de un paciente de cáncer (Tabla 10).

Tabla 9. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de K-ras humano por PCR en tiempo real, en muestras de tejidos, plasmas y FCS extraídas de ratones NOD-SCID inoculados con células NIH-3T3 y hASCs, cultivadas en contacto directo con plasmas de pacientes, plasmas de sujetos sanos y cultivadas en su medio de cultivo habitual. NT: no desarrollo de tumor; (-): muestras no analizadas.

Células inoculadas	Tamaño muestral (n)	K-ras mutado TUMOR	K-ras no mutado TUMOR	K-ras mutado HÍGADO	K-ras no mutado HÍGADO	K-ras mutado PULMÓN	K-ras no mutado PULMÓN	K-ras mutado PLASMA	K-ras no mutado PLASMA	K-ras mutado FCS	K-ras no mutado FCS
NIH-3T3 + plasma de pacientes	4	4	4	4	4	4	4	3	3	1	3
NIH-3T3 + plasma sano	2	NT	NT	-	2	-	2	-	2	-	2
NIH-3T3 + medio de cultivo habitual	3	NT	NT	-	0	-	0	-	0	-	0
hASCs + plasma de pacientes	6	NT	NT	2	3	0	3	0	0	2	2
hASCs + plasma sano	3	NT	NT	-	1	-	1	-	0	-	1
hASCs + medio de cultivo habitual	4	NT	NT	-	1	-	0	-	0	-	1
SW-480 (control +)	3	3	2	3	3	3	3	3	3	1	3

Tabla 10. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de K-ras humano por PCR en tiempo real, en muestras de tejidos, plasmas y FCS extraídas de ratones NOD-SCID inoculados con células NIH-3T3 y hASCs, cultivadas en el sistema de placas con membrana (sistema Transwell®) con plasmas de pacientes, plasmas de sujetos sanos y cultivadas en su medio de cultivo habitual. NT: no desarrollo de tumor; (-): muestras no analizadas.

Células inoculadas	Tamaño muestral (n)	K-ras mutado TUMOR	K-ras no mutado TUMOR	K-ras mutado HÍGADO	K-ras no mutado HÍGADO	K-ras mutado PULMÓN	K-ras no mutado PULMÓN	K-ras mutado PLASMA	K-ras no mutado PLASMA	K-ras mutado FCS	K-ras no mutado FCS
NIH-3T3 + plasma de pacientes	1	1	1	1	1	1	1	0	0	-	-
NIH-3T3 + plasma sano	1	NT	NT	-	1	-	1	-	0	-	-
NIH-3T3 + medio de cultivo habitual	1	NT	NT	-	0	-	0	-	0	-	-
hASCs + plasma sano	1	NT	NT	-	0	-	1	-	0	-	-
hASCs + medio de cultivo habitual	1	NT	NT	-	0	-	-	-	0	-	-

7.4. Detección de secuencias mutadas y no mutadas de *k-ras* murino.

Se analizaron las muestras de tejidos y de FCS de todos los ratones y no se encontró la secuencia mutada de *k-ras* en ningún caso, excepto en una muestra de hígado de un ratón inoculado con células NIH-3T3 cultivadas con plasma de un paciente. Por otro lado, todas las muestras analizadas fueron positivas para la detección de secuencias no mutadas de *k-ras* de ratón.

DISCUSIÓN

Discusión

1. Valor pronóstico y diagnóstico de la detección de secuencias mutadas de K-ras en plasma de pacientes con CCR.

Desde que se realizó por primera vez la detección de CNAPS en pacientes con cáncer (Leon *et al.*, 1977), y posteriormente se demostraron sus características neoplásicas (Stroun *et al.*, 1989), la idea de buscar en ellos herramientas clínicas ha ganado interés en la comunidad científica.

La identificación de nuevos marcadores moleculares para la detección temprana del CCR se ha convertido en un objetivo importante, ya que las técnicas utilizadas hoy en día para su diagnóstico, o bien son técnicas que pueden dar lugar tanto a falsos positivos como a negativos (detección de sangre oculta en heces), o bien son técnicas altamente invasivas (colonoscopia; Flamini *et al.*, 2006).

Son numerosos los marcadores que han sido estudiados en el CCR, como por ejemplo el CEA y el CA19-9, pero de su baja sensibilidad para el diagnóstico (Flamini *et al.*, 2006) deriva en la necesidad de encontrar nuevos marcadores más sensibles y que permitan un mejor seguimiento de los pacientes.

La detección de CNAPS en los pacientes de cáncer representa una nueva alternativa no invasiva para llevar a cabo no sólo un diagnóstico, sino también como método pronóstico y de monitorización de la enfermedad. Teniendo en cuenta que ha sido demostrado que parte del ADN circulante en el plasma de los pacientes con cáncer tiene su origen en el tumor (Anker *et al.*, 1997), y que muchas de las alteraciones encontradas en el tumor se detectan también en el plasma de los pacientes (Anker *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2002), parecería lógico pensar en buscar en estas alteraciones posibles marcadores tumorales. En este contexto el oncogén K-ras es uno de los genes más estudiados (Johnson *et al.*, 2002; Lecomte *et al.*, 2002; Tong *et al.*, 2006; Lefebure *et al.*, 2009).

El porcentaje de tumores colorrectales con mutaciones puntuales en el oncogén K-ras varía, según la bibliografía, entre el 40 y el 50 % (Anker *et al.*, 1999; Guerrero *et al.*, 2002; Lecomte *et al.*, 2002; Lefebure *et al.*, 2009). Sin embargo, en el presente estudio, se secuenciaron 252 tumores colorrectales primarios, de los cuales, sólo el 25%, presentó una mutación puntual en el codón 12 del exón 1 del oncogén K-ras.

Por otro lado, en el 81% de los pacientes cuyos tumores primarios tuvieron K-ras mutado, también se detectaron estas secuencias mutadas en los plasmas, mediante PCR en tiempo real. Este porcentaje es superior al encontrado por algunos autores, en cuyos estudios se establece en un 45% (Lecomte *et al.*, 2002), pero es similar al reportado por otros (Anker *et al.*, 1997).

El amplio espectro de cánceres que presentan mutaciones en *K-ras*, puede que haga pensar en su limitada especificidad para utilizarlo como marcador tumoral, pero, el hecho es que las mutaciones detectadas en el plasma de los pacientes de CCR son muy específicas de este tipo de cáncer y que éstas no se encuentran en el plasma de voluntarios sanos (Johnson *et al.*, 2002). Así lo confirman nuestros resultados ya que la misma mutación que estaba presente en los tumores primarios se encontró en los plasmas de los pacientes, y nunca se detectó en los plasmas de los sujetos sanos.

Por otro lado las mutaciones de *K-ras* ocurren de manera temprana en el desarrollo del CCR y están muy caracterizadas, lo cual hacen de *K-ras* un buen marcador ya que se puede detectar en estadios tempranos de la enfermedad (Johnson *et al.*, 2002).

Además, el interés por el estudio de los CNAPS, no sólo se centra en su posible valor clínico, sino que también podrían dar una idea de las múltiples alteraciones que están presentes en el tumor, así como evitar posibles errores en el diagnóstico histológico, motivo de elevada preocupación en la clínica (Johnson *et al.*, 2002).

Todos estos hechos unidos a que las técnicas de laboratorio que se utilizan hoy en día son capaces de detectar y cuantificar cantidades extremadamente pequeñas de ácido nucleicos circulantes y de sus alteraciones (revisado en Fleischhacker, 2007), hacen que merezca la pena seguir profundizando en su estudio para utilizarlos como valor pronóstico y diagnóstico en los pacientes de cáncer, en particular de CCR y establecerlos definitivamente como marcadores tumorales, utilizando una técnica mínimamente invasiva para su adquisición como es la obtención de una muestra de sangre.

2. Utilidad del método descrito para detección de secuencias mutadas de *K-ras*.

La metodología empleada adquiere especial relevancia en el análisis de las muestras plasmáticas ya que la detección de mutaciones puntuales en un entorno mayoritario de ADN no mutado, es especialmente complejo (Lefebure *et al.*, 2009).

En este estudio se muestra también la puesta a punto de un método de detección de mutaciones puntuales en el codón 12 del exón 1 del oncogén *K-ras*, mediante una técnica de PCR en tiempo real, con la utilización de sondas de hibridación (sondas FRET) en combinación con oligómeros ácido péptido nucleicos (sonda PNA). Este método ha resultado tener los siguientes beneficios:

- Rápido: se completa en aproximadamente 1 hora.
- Sensible: es capaz de amplificar muestras de ADN a partir de una cantidad de 2 ng. Además, las pruebas de sensibilidad realizadas, mostraron que, con esta técnica, se pudo detectar ADN tumoral, como mínimo, en un exceso de mil veces más de ADN no tumoral, lo cual pone de manifiesto la potencia de la técnica, y la hace fiable a la hora de detectar ADN mutado en un entorno mayoritario de ADN no mutado.

- Específico: el resultado obtenido en el análisis del ADN de los tumores se confirmó por secuenciación en el 100% de los casos, y nunca dio positivo una muestra no tumoral.

La secuencia del oligómero PNA se diseñó para suprimir la amplificación de las secuencias no mutadas de *K-ras* humano. La concentración de esta sonda es crucial para el buen funcionamiento del método, ya que, si no se ajusta convenientemente, da lugar a falsos positivos (amplificación de secuencias de ADN sin mutación). En nuestro estudio, concentraciones menores a 2 μM (1 y 1,5 μM) no consiguieron la inhibición total de la amplificación del ADN no mutado.

El uso de sondas FRET y PNA fue previamente probado con éxito por algunos autores, en distintos tipos de muestras biológicas (Chen *et al.*, 2004; Däbritz *et al.*, 2005), pero han sido necesarias diversas modificaciones para aplicarlas al tipo de muestras que utilizamos en este estudio: ADN procedente de tumores colorrectales primarios, de plasmas humanos, y de células en cultivo.

Los plasmas analizados fueron sometidos a dos centrifugaciones consecutivas, para asegurar la ausencia de células (Zhong *et al.*, 2007). El intentar eliminar las posibles células presentes en las muestras plasmáticas, es un punto crucial a la hora de estudiar los CNAPS ya que, si estas células no se eliminan, podría haber un porcentaje de ácidos nucleicos de origen celular en las muestras de plasma que serían considerados erróneamente como ácidos nucleicos circulantes libres.

3. Capacidad transfectante del ADN extraído de tumores.

Los primeros experimentos que se llevaron a cabo para intentar responder preguntas acerca de si el ADN extraído de tumores era capaz de transformar células en cultivo datan de los años 80 (Chiaho Shih *et al.*, 1981; Pulciani *et al.*, 1982). Más adelante, García Olmo y cols., plantearon que el ADN libre podría ser capaz de transfectar y malignizar células en órganos diana a distancia en pacientes con CCR (García-Olmo *et al.*, 1999; García-Olmo *et al.*, 2000; García-Olmo *et al.*, 2001). De esta forma surgió el interés por determinar, entre otras cosas, qué tipo de células podrían ser susceptibles de sufrir este proceso.

En el presente trabajo se han utilizado las líneas celulares NIH-3T3 y hASCs. Las primeras son fibroblastos de ratón inmortalizados, que tienen delecionado el gen supresor de tumores p16, característica que ha hecho que sean células frecuentemente utilizadas en estudios de transformación oncogénica por *ras*, ya que ha sido descrito que fibroblastos murinos carentes de p16 son transformadas oncogénicamente por dicho gen (Serrano *et al.*, 1997). Por otro lado, esta transformación no se da en células que no sufren ningún tipo de alteración (Serrano *et al.*, 1997).

Las células hASCs son una línea de células madre pluripotentes utilizadas en ensayos clínicos gracias a su excelente perfil de seguridad (García-Olmo *et al.*, 2009). Se ha demostrado su

resistencia a la incorporación de secuencias génicas externas mediante métodos de transfección comunes, especialmente los métodos no virales (Wang *et al.*, 2009).

Los experimentos de transfección mediante el método del fosfato cálcico realizados en este trabajo, muestran que el ADN libre extraído de tumores colorrectales es capaz de introducirse en células NIH-3T3 en cultivo, ya que se pudo comprobar que estas células incorporan secuencias mutadas del oncogén *K-ras* humano y las mantienen a lo largo del tiempo. Se utilizó la técnica del fosfato cálcico para generar un entorno óptimo, y se comprobó que únicamente las células NIH-3T3 incorporaban dichas secuencias. La delección en p16 en las células NIH-3T3 ha sido, probablemente, el motivo de la transfección estable de estas células con ADN de origen tumoral.

Cuando se realizaron los mismos experimentos con células hASCs, no hubo tal transfección. Es decir, no se detectaron secuencias mutadas de *K-ras* humano en ningún ensayo. Hay autores que muestran en sus estudios la transformación espontánea de dichas células, cuestionado así su bioseguridad (Rubio *et al.*, 2005), aunque el mismo grupo en un artículo reciente comprueba que dicha transformación se debió en realidad a una pequeña contaminación cruzada de los cultivos de las células hASCs con células tumorales (García *et al.*, 2010). Nuestros resultados nos hacen pensar que las células hASCs no parecen susceptibles a la transformación oncogénica, ni siquiera tratándolas directamente con ADN tumoral.

Se obtuvieron los mismos resultados cuando se cultivaron ambas líneas celulares con sobrenadante recogido del cultivo de células SW-480. Recordemos que las células SW-480 son de adenocarcinoma de colon humano, y que tienen en homocigosis la mutación Gly12Val en el exón 1 del oncogén *K-ras*. En todos los cultivos realizados con células NIH-3T3 y estos sobrenadantes previamente centrifugados, éstas incorporaron la secuencia mutada del gen *K-ras* humano de la misma manera que observó el grupo de Anker y cols. (Anker *et al.*, 1994). Por el contrario las células hASCs no incorporaron dicha secuencia, confirmando una vez más la susceptibilidad de las células NIH-3T3 para incorporar secuencias foráneas, y apuntando hacia una potencial capacidad transfectante de los ácidos nucleicos liberados de células en cultivo.

4. Capacidad transfectante del plasma humano.

Desde que empezaron a aparecer los primeros trabajos acerca de que la adquisición de fenotipos malignos por parte de células normales podía ser debido a la transmisión de oncogenes dominantes por parte de células tumorales (Pulciani *et al.*, 1982; Chiaho Shih *et al.*, 1981), y se describió que en el plasma de pacientes de cáncer circulaba ADN tumoral (Leon *et al.*, 1977; Anker *et al.*, 1989), la idea de que el plasma de los pacientes estuviera implicado en la adquisición de dicho fenotipos ha ido adquiriendo cada vez más interés (Anker *et al.*, 1994; García-Olmo *et al.*, 1999). Por otro lado, ha sido descrito cómo el ADN tumoral procedente de

fibroblastos de ratón transformados, es capaz de transfectar a su vez a células NIH-3T3 en cultivo (Chiaho Shih *et al.*, 1981). Estas evidencias plantean la siguiente pregunta: ¿puede el plasma procedente de pacientes con cáncer transfectar células en cultivo?

El reto de nuestro estudio fue realizar los cultivos celulares directamente con el plasma de los pacientes de CCR, ya que no encontramos, hasta la fecha, ningún trabajo en el que hubieran utilizado esta metodología de cultivo. Cuando se realizaron los cultivos de ambas líneas celulares con el plasma de los pacientes, en las células hASCs nunca se detectaron secuencias mutadas de *K-ras* humano, mientras que sí se detectaron en los cultivos con células NIH-3T3, que además también fueron positivas para la detección de secuencias no mutadas del mismo gen. Por tanto, las células hASCs fueron resistentes a la incorporación de ADN libre presente en el plasma de pacientes con CCR, mientras que las células NIH-3T3 fueron capaces de incorporar secuencias génicas mediante la incubación con los plasmas.

El hecho de que la simple incubación de las células NIH-3T3 con los plasmas diera lugar a su transfección, sugiere la eficacia de este fenómeno. Resulta sorprendente que los resultados fueran similares al transfectar las células NIH-3T3 con el ADN procedente de tumores colorrectales. Pero, más aún, cuando se cuantificaron las cantidades de *K-ras* mutado en dichas muestras, se encontró que el plasma contenía aproximadamente 1000 veces menos ADN tumoral ($0,003 \pm 0,002$ pg) que el empleado para la transfección ($3,05 \pm 1,93$ pg). Las bajas concentraciones de ADN mutado en los plasmas, y el hecho de que estas secuencias sean incorporadas por las células mediante la simple adición del plasma sin una extracción previa del ADN, vuelve a sugerir la considerable eficiencia del fenómeno de transfección de los plasmas humanos.

Por otra parte, cuando transfectamos las células NIH-3T3 con ADN extraído de muestras de FCS de seis voluntarios sanos, detectamos secuencias de *K-ras* humano en solo tres de los seis cultivos. Sin embargo, cuando se cultivaron con el plasma de doce voluntarios sanos, la detección de secuencias de *K-ras* humano fue del 100%. Parece ser, a la vista de estos resultados, que la eficacia de transfección con ADN purificado es incluso menor que cuando los cultivos se hacen con adición directa de plasma humano.

Asimismo, comprobamos que las células NIH-3T3 habían sido capaces de incorporar otras secuencias no directamente relacionadas con el proceso canceroso, como un polimorfismo del exón 4 de p53, y una secuencia del gen que codifica la β -globina. En los experimentos de transfección con ADN extraído de tumores, las NIH-3T3 incorporaron estas secuencias en dos de los seis cultivos realizados, y en los experimentos de cultivo con plasmas humanos, en seis de ocho. Estos datos reafirman los resultados obtenidos por Chiaho Shih y cols. hace casi tres décadas (Chiaho Shih *et al.*, 1981). Concretamente, observaron que el ADN tumoral era capaz de transfectar células NIH-3T3, y que éstas estabilizaban el ADN humano (Chiaho Shih *et al.*, 1981). Ésto pareció ser posible debido a que las células que eran capaces de adquirir dicho

ADN, también incorporaban a la vez otras secuencias humanas que entran en ellas durante el mismo proceso de transfección. Por el contrario, las células que no eran capaces de incorporar el ADN tumoral, tampoco incorporaban el resto de secuencias (Chiaho Shih *et al.*, 1981). Todo lo expuesto, podría ser también aplicable a los resultados obtenidos en el presente trabajo con el cultivo con plasma humano, y que, probablemente, la elevada eficacia del proceso de deba, en parte, a la cooperación de varias secuencias en conjunto, las cuales acompañarían al ADN tumoral y sin las que el proceso no sería tan eficaz. Ésto nos llevaría a su vez a plantear que quizá, por este motivo, la cantidad de ADN tumoral presente en los plasmas de los pacientes, no sea tan relevante para el proceso de transfección como su “calidad”.

Una vez demostrado que las células NIH-3T3 eran capaces de incorporar secuencias génicas humanas, nos preguntamos si este ADN podría recombinar con el de las células hospedadoras, generando mutaciones similares en su genoma. En 1999, el grupo de Holmgren y cols. (Holmgren *et al.*, 1999), observó que el ADN puede ser transferido de unas células a otras mediante la fagocitosis de cuerpos apoptóticos. Una vez transferido, detectaron su expresión a nivel de proteína y mRNA en las células receptoras, concluyendo así que el ADN puede ser rescatado de los cuerpos apoptóticos y reutilizado por las células somáticas (Holmgren *et al.*, 1999). Avanzando un paso más, el grupo de Bergsmedh y cols., estudió la posible transferencia horizontal de material genético de unas células a otras, pero aportando la característica de que este ADN fuera tumoral (Bergsmedh *et al.*, 2001). Utilizaron fibroblastos de rata transfectados con H-rasv12 y c-myc como fuente de cuerpos apoptóticos, los cuales incubaron con células de ratón (MEFs -*Mouse Embryonic Fibroblasts*-). Estudios con la técnica FISH (del inglés *Fluorescence in situ Hybridation*) revelaron que el núcleo de las células MEFs contenía cromosomas murinos, cromosomas de rata, y cromosomas fusionados ratón-rata. El DNA transferido se propagaba, siempre que fuera capaz de conferir una ventaja selectiva a la célula hospedadora fagocítica, y que ésta fuera p53 negativa. Estos resultados sugieren que la transferencia lateral de ADN entre células eucarióticas podría dar lugar a aneuploidías, y a una acumulación de cambios genéticos que serían necesarios para la transformación tumoral (Bergsmedh *et al.*, 2001).

Otros estudios han mostrado cómo el ADN es capaz de ser transferido a células receptoras, y expresado en ellas, pero no se replica porque es bloqueado por la activación de la vía p53-p21 (Bergsmedh *et al.*, 2001). En una publicación reciente, Ehnfors y cols., analizaron si el ADN tumoral puede ser transferido a células endoteliales, dentro del microambiente tumoral, y replicarse (Ehnfors *et al.*, 2009). Estos autores han mostrado cómo el ADN, que deriva de cuerpos apoptóticos de células de fibrosarcoma de rata que expresan H-ras^{V12}, c-myc humano y el oncogén SV40LT, es transferido y transforma fibroblastos primarios y células endoteliales *in vitro*. Aunque las células normales pueden captar ADN mediante transferencia génica horizontal, éste no se propaga debido a la activación de la vía p53-p21. En este estudio los

autores muestran como células transfectadas con el oncogén SV40LT pueden superar esta protección, presumiblemente por la inactivación de p53, que permitiría la transferencia y replicación del ADN transferido en las células hospedadoras normales (Ehnfors *et al.*, 2009).

En el presente estudio, para comprobar si el ADN tumoral podría haberse recombinado con el de las células hospedadoras, generando mutaciones similares en su genoma, examinamos la presencia de secuencias mutadas del oncogén *k-ras* murino en el ADN de las células NIH-3T3 cultivadas con los plasmas humanos, y en las transfectadas con ADN extraído de tumores. Nuestros resultados, obtenidos mediante la técnica MASA, mostraron que ningún cultivo fue positivo para las secuencias mutadas de *k-ras* murino, a pesar de sí serlo para las de *K-ras* humano, sugiriendo así que en la transfección estable de las secuencias foráneas, no medió un proceso de recombinación.

5. Capacidad transformante del plasma humano.

Después de haber demostrado que el ADN tumoral que circula en el plasma de los pacientes de CCR es capaz de transfectar células en cultivo, la siguiente pregunta que nos planteamos fue: ¿esta transfección da lugar a una transformación oncogénica?

Ya en los años 80, los trabajos de Goldenberg y cols. (Goldenberg *et al.*, 1981; Goldenberg *et al.*, 1982) revelaron que células tumorales humanas, inyectadas en ratones desnudos, eran capaces de producir tumores en los animales, pero también de inducir malignidad en las células del hospedador (Goldenberg *et al.*, 1981; Goldenberg *et al.*, 1982). Plantearon varias posibles explicaciones para el fenómeno que habían observado, entre ellas: procesos en los que mediaban virus oncogénicos, implicación de microorganismos, secreción de “productos celulares” responsables de la transformación, mecanismos de fusión celular, etc. Postulaban que un proceso neoplásico es un proceso continuo mediante el cual las células tumorales son capaces de transferir su genotipo maligno a las células normales (Goldenberg *et al.*, 1981; Goldenberg *et al.*, 1982). Para verificar el resultado, utilizaron varios tumores humanos de distintos orígenes para implantarlos en los ratones desnudos, y con todos observaron el mismo proceso: se desarrollaban tumores en los ratones, y al aislar las células de la masa tumoral e inyectarlas de nuevo en los animales, volvían a generarse tumores (Goldenberg *et al.*, 1981; Goldenberg *et al.*, 1982). El que los resultados se repitieran utilizando células procedentes de tumores de diversos orígenes, les llevó a pensar en que debía de ser un fenómeno habitual en la naturaleza. Acuñaron el término de “genes transformantes” para referirse a los genes implicados en dicha transformación (Goldenberg *et al.*, 1982).

Nuestros resultados mostraron que, cuando las células NIH-3T3 transfectadas mediante el cultivo con plasmas de pacientes con CCR, se inoculaban en ratones inmunodeficientes NOD-SCID, se desarrollaban tumores, que histológicamente se correspondían con carcinomas indiferenciados. Además, se detectaron secuencias mutadas de *K-ras* humano en los hígados,

pulmones, plasmas y FCS de estos animales, así como en los tumores generados, de una forma similar a cuando se inocularon células de adenocarcinoma de colon humano (células SW-480), utilizadas como controles positivos.

Por tanto, cuando las células NIH-3T3 fueron cultivadas con los plasmas de pacientes con CCR, adquirirían actividad oncogénica, similar a la observada cuando se inyectaban células tumorales. Vistos los resultados del grupo de Goldenberg, podríamos aventurarnos a proponer que los “genes transformantes” que ellos describían, puedan tener relación con los oncogenes presentes en el plasma de los pacientes de cáncer; y el fenómeno que ellos observaron, podría estar relacionado con el que hace una década se denominó como “genometástasis” (García Olmo *et al.*, 1999; García-Olmo *et al.*, 2000).

En 1999, se postuló la denominada “Hipótesis de las Genometástasis” según la cual, las metástasis ocurrirían a través la transfección de células susceptibles localizadas en órganos diana a distancia mediante oncogenes dominantes que derivarían del tumor primario, y que circulan en el plasma de los pacientes de cáncer (García Olmo *et al.*, 1999; García-Olmo *et al.*, 2000).

En el presente estudio, el contacto directo de las células NIH-3T3 con los plasmas de pacientes provocó un cambio en las mismas, mediado probablemente, por transferencia génica, y este fenómeno tiene como resultado una transformación oncogénica. Estos resultados apoyarían la idea de que el plasma de pacientes con cáncer es portador de material génico capaz de transfectar y transformar células susceptibles; en definitiva, demuestra la factibilidad del fenómeno denominado “genometástasis” (García Olmo *et al.*, 1999; García-Olmo *et al.* 2000).

La transformación oncogénica de las células NIH-3T3 ocurrió de igual forma cuando éstas se cultivaron separadas del plasma por una membrana de 0,4 µm de diámetro de poro: las células incorporaron secuencias mutadas del oncogén K-*ras* humano, y al inocularlas en un ratón NOD-SCID, el animal desarrolló un tumor y se pudieron detectar secuencias mutadas y no mutadas de K-*ras* humano en las muestras extraídas. De estos resultados deducimos que no parece ser tan importante el hecho de que las células estén en contacto con el plasma de los pacientes, como que el ADN con propiedades oncogénicas sea capaz de “viajar” a través del plasma, evadir la respuesta inmune del organismo y alcanzar a las células susceptibles.

Parece ser, por tanto, que existe una transferencia horizontal de ADN entre las células del tumor y otras células somáticas, y que esta transferencia vendría mediada por los ácidos nucleicos extracelulares, con características transformantes, que circulan en sangre.

6. Función/actividad biológica de los CNAPS.

Las evidencias que señalan hacia la posible función biológica de los CNAPS se han incrementado en los últimos años, pero revisando escrupulosamente la bibliografía, pueden

encontrarse antiguos estudios que son coherentes con esta idea, especialmente en el ámbito del cáncer.

En el año 1974 el grupo de Zaenen y cols. descubrieron como la formación de agallas en las plantas se producía por la transferencia génica de ADN entre la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y las células de la planta (Zaenen *et al.*, 1974). Este ADN se integraba eventualmente en el genoma de las células, se adueñaba de parte de la maquinaria celular, y daba como resultado un fenotipo tumoral (Zaenen *et al.*, 1974). El ADN foráneo podía moverse libremente de una célula a otra de la planta entrando en el núcleo. La información se transcribía y se expresaba, desencadenando la formación de tumores secundarios, esto es, metástasis (Zaenen *et al.*, 1974). Partiendo de la base de que las plantas están fijas en su posición, y no son capaces de moverse como los animales, parecería lógico pensar que el “principio transformante” debía estar circulando.

Avanzando un poco en el tiempo, aparecieron estudios que aportaban datos acerca de la transferencia de información célula a célula, de manera que el ADN aislado del sobrenadante de células T que habían sido expuestas a virus, cuando se inyectaba en ratones desnudos, era capaz de provocar la síntesis de anticuerpos específicos contra estos virus (Anker *et al.*, 1980; Anker *et al.*, 1984).

En el año 1994 el mismo grupo publicó un estudio acerca de la posible función biológica de los ácidos nucleicos extracelulares (Anker *et al.*, 1994) y más adelante se describió por primera vez el fenómeno de transferencia horizontal en células somáticas (Holmgren *et al.*, 1999).

No son muy numerosos los investigadores que a lo largo de los años se han atrevido a plantear la posibilidad de que los CNAPS sean capaces de transformar oncogénicamente células normales y desarrollar tumores. En otras palabras, si los CNAPS son biológicamente activos y si tienen el suficiente potencial como para desarrollar tumores *in vivo* participando activamente en la generación de las metástasis en los pacientes de cáncer (revisado en Fleischhacker, 2007). Creemos que con este trabajo hemos dado respuesta a parte de estas preguntas. Cuando las células NIH-3T3 fueron cultivadas con los plasmas de pacientes con CCR, adquirieron actividad oncogénica y dicha actividad es similar a la observada cuando se inyectan células tumorales en ratones inmunodeficientes. Estos datos son un firme apoyo para reforzar el concepto de genometástasis propuesto hace una década, del que deriva la idea de que los ácidos nucleicos que circulan en el plasma de los pacientes de cáncer tienen una función biológica (García-Olmo *et al.*, 2010).

7. Posible implicación de las partículas encontradas en el plasma humano en su capacidad transformante.

Cuando estudiamos mediante microscopía electrónica las membranas que contenían el plasma de los pacientes con los que se habían cultivados las células NIH-3T3 (sistema Transwell®), los análisis revelaron que los plasmas no contenían células, lo cual confirma que la doble centrifugación a la que fueron sometidas las muestras de plasma antes de realizar los experimentos, es un tratamiento eficaz para eliminar las células remanentes (Swinkels *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2003; Chiu *et al.*, 2001). Este resultado excluye la posibilidad de que la transfección y transformación oncogénica de las células NIH-3T3 haya sido por la presencia de células tumorales circulantes presentes en el plasma de los pacientes.

Las membranas con el plasma no contenían células, pero pudimos observar que contenían partículas, algunas de las cuales aparecían atravesando los poros de las membranas, con lo cual su tamaño era menor que el diámetro de los mismos (0,4 μm). En el año 1994 el grupo de Anker y cols., mostraron como células tumorales eran capaces de liberar espontáneamente partículas que podrían transformar células no tumorales en cultivo (Anker *et al.*, 1994). Además ha sido demostrado como cuerpos apoptóticos que contienen ADN tumoral, son capaces de transferir su contenido génico a otras células eucariotas mediante transferencia horizontal (Bergsmedh *et al.*, 2001; Ehnfors *et al.*, 2009).

La idea prevalente de que el intercambio extracelular de información genética está restringido en las células eucarióticas, está cambiando con los estudios recientes sobre exosomas, cuerpos apoptóticos y péptidos que unen ácidos nucleicos, los cuales están proporcionando nuevas vías para la comunicación célula a célula, con implicaciones en salud y enfermedad (revisado en Belting, 2008). Por otro lado, es comúnmente asumido que el ADN extracelular encontrado en el plasma, es susceptible de ser degradado por DNAsas presentes en la sangre, pero, es bien sabido los elevados niveles de ADN plasmático que presentan los pacientes con cáncer respecto a sujetos sanos, lo cual hace pensar en la existencia de inhibidores de estas enzimas presentes en la sangre o bien que este ADN vaya protegido en partículas (Kopreski *et al.*, 1997).

Los exosomas son activamente secretados al espacio extracelular vía exocitosis mediante la fusión de la membrana limitando el endosoma con la membrana de la superficie celular. Estas partículas, de tamaño similar (revisado en Belting, 2008) al que nosotros hemos observado en las muestras de los plasmas, consideradas artefactos durante mucho tiempo, están siendo ahora reconocidas como estructuras específicas que participan en diferentes procesos biológicos como coagulación, inflamación y progresión tumoral (Cocucci *et al.*, 2009). La liberación de estos exosomas está aumentada en células tumorales, como demuestran estudios *in vitro*, y son abundantes en el plasma y efusiones ascíticas y pleurales de pacientes con cáncer (Iero *et al.*, 2008). A la vista de las observaciones de todos estos grupos, las partículas que hemos encontrado en el plasma de los pacientes de CCR, probablemente estén implicadas en el

fenómeno de transfección y transformación oncogénica que observamos en las células NIH-3T3. Habría que determinar si estas estructuras contienen material genético transformante y de qué forma se produce la interacción entre dichas partículas y las células NIH-3T3 para que se de una posible transferencia de material genético. Se ha descrito que las posibles formas de comunicación celular serían la interacción a través de receptores, la fusión directa con la membrana celular o bien la internalización en un fragmento de membrana celular que daría lugar a un endosoma (Cocucci *et al.*, 2009).

Un trabajo reciente ha sugerido que mastocitos murinos y humanos secretan exosomas que contienen mRNAs (Valadi *et al.*, 2007). Lo importante de este hallazgo es, que dicho material genético procedente de las células murinas, es transferido a mastocitos humanos, los cuales actuarían como células receptoras. En los mastocitos humanos encontraron proteínas humanas, pero también proteínas murinas, con lo cual muestran la posible actividad biológica de estos ácidos nucleicos particulados e indican que podrían afectar a la producción de proteínas y a la expresión génica de las células receptoras (Valadi *et al.*, 2007). Al estudiar el contenido de dichos exosomas no encontraron ADN, sin embargo, otros grupos sí han encontrado este tipo de ácido nucleico encapsulado en partículas, capaces de transferir su contenido a otras células somáticas mediante transferencia horizontal, el cual se integra en el núcleo de las células recipientes y allí se expresa (Bergsmedh *et al.*, 2001). Nuestros resultados sugieren que la transformación oncogénica de las células NIH-3T3 al estar en contacto con ADN de origen tumoral, se podría deber a este tipo de ácido nucleico y que, muy probablemente se encuentre asociado, de alguna forma, a las partículas que hemos encontrado en el plasma de los pacientes.

En el estudio de Valadi y cols., encontraron también que los exosomas contenían 121 miARNs (Valadi *et al.*, 2007). Recientemente se ha estudiado el papel de estos miARNs en cáncer y metástasis, como posibles activadores de los procesos metastáticos, supresores y/o marcadores de metástasis (Nicoloso *et al.*, 2009). También se ha estudiado su posible papel en la comunicación célula a célula y su aplicación terapéutica (Yuan *et al.*, 2009). A la vista de estos resultados sería muy interesante caracterizar las partículas que hemos encontrado en el plasma de los pacientes en busca de este tipo de material genético para poder determinar si están participando de alguna forma en la transformación oncogénica de las células NIH-3T3 y así poder aportar datos en la formación de metástasis en los pacientes con CCR, ya que hoy en día se están empezando a desarrollar terapias en cáncer dirigidas a este tipo de vesículas (Wright, 2008).

En resumen, y como resultados más sugerentes, nuestro estudio confirma la presencia de ADN tumoral en un alto porcentaje de plasmas de pacientes de CCR, y que este ADN extracelular es capaz de transfectar células susceptibles en cultivo, las cuales adquieren

características oncogénicas *in vitro*, que las hace comportarse como tumorales en un modelo animal.

Todo ello asienta las bases para futuros trabajos en los que se estudie el efecto transformante que los ácidos nucleicos libres en el plasma pudieran tener sobre células susceptibles, identificar que tipo de células pueden serlo, y estudiar las características de las partículas encontradas en el plasma de los pacientes cancerosos. Establecer qué propiedades tienen estas partículas que las puedan hacer propicias para participar en dicha transformación, y qué relación tendrían todos estos fenómenos con la generación de las metástasis. Todo ello contribuirá a un mejor conocimiento de los mecanismos de progresión tumoral, a un posible establecimiento de nuevos métodos de diagnóstico, pronóstico y, lo que es más importante, de tratamiento para los pacientes de CCR.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Con la técnica de PCR en tiempo real empleada en este estudio y basada en la combinación de un oligómero PNA y sondas fluorescentes de hibridación (sondas FRET), es posible detectar mutaciones puntuales en el codón 12 del exón 1 del gen *K-ras* de manera rápida, sensible y específica, en un entorno mayoritario de ADN no mutado.
2. Se confirma la presencia de ADN tumoral extracelular en un alto porcentaje (81%) de plasmas de pacientes con CCR, cuyos tumores primarios presentaron mutaciones en el codón 12 del exón 1 del gen *K-ras*.
3. Aplicando un protocolo basado en el uso de fosfato cálcico, es posible transfectar células NIH-3T3 con ADN extraído de tumores colorrectales. Sin embargo, esta transfección no se logra en células hACS.
4. El plasma de pacientes con CCR tiene capacidad transfectante sobre células susceptibles en cultivo y no sobre células madre adultas humanas.
5. El fenómeno de transferencia génica mediado por la adición de plasma al medio de cultivo de células NIH-3T3, parece un fenómeno altamente eficaz, ya que el ADN presente en este fluido está sin aislar y en cantidades muy inferiores a las utilizadas en ensayos de transfección con otro material biológico. Asimismo, este fenómeno no se limita a secuencias relacionadas con la carcinogénesis.
6. El plasma de pacientes con CCR tiene capacidad de transformar oncogénicamente células NIH-3T3 en cultivo, de forma que al ser después inoculadas en animales inmunodeficientes, generan carcinomas indiferenciados.
7. Los plasmas de los pacientes con CCR poseen micropartículas de tamaño inferior a 0,4 μm , que podrían estar implicados en los fenómenos de transfección y transformación oncogénica observados tras el cultivo de células NIH-3T3 con ese tipo de plasmas.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

Acharya S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, Kolodner R, Fishel R (1996) hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13629-13634.

Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, Bunn PA, Jr., Stemmerman G, Wells JD, Macdonald JS, Meyskens FL, Jr. (1998) Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res* 58:1149-1158.

Anker P, Jachertz D, Maurice PA, Stroun M (1984) Nude mice injected with DNA released by antigen stimulated human T lymphocytes produce specific antibodies expressing human characteristics. *Cell Biochem Funct* 2:33-37.

Anker P, Jachertz D, Stroun M, Brogger R, Lederrey C, Henri J, Maurice PA (1980) The role of extracellular DNA in the transfer of information from T to B human lymphocytes in the course of an immune response. *J Immunogenet* 7:475-481.

Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Chen XQ, Stroun M, Mulcahy HE, Farthing MJ (1997) K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 112:1114-1120.

Anker P, Lyautey J, Lefort F, Lederrey C, Stroun M (1994) Transformation of NIH/3T3 cells and SW 480 cells displaying K-ras mutation. *C R Acad Sci III* 317:869-874.

Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M (1999) Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 18:65-73.

Arango D, Mariadason JM, Wilson AJ, Yang W, Corner GA, Nicholas C, Aranes MJ, Augenlicht LH (2003) c-Myc overexpression sensitises colon cancer cells to camptothecin-induced apoptosis. *Br J Cancer* 89:1757-1765.

Barbacid M (1987) ras genes. *Annu Rev Biochem* 56:779-827.

Beck J, Urnovitz HB, Riggert J, Clerici M, Schutz E (2009) Profile of the circulating DNA in apparently healthy individuals. *Clin Chem* 55:730-738.

Belting M, Wittrup A (2008) Nanotubes, exosomes, and nucleic acid-binding peptides provide novel mechanisms of intercellular communication in eukaryotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol* 183:1187-1191.

Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz AL, Holmgren L (2001) Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6407-6411.

Boddy JL, Gal S, Malone PR, Harris AL, Wainscoat JS (2005) Prospective study of quantitation of plasma DNA levels in the diagnosis of malignant versus benign prostate disease. *Clin Cancer Res* 11:1394-1399.

Boland CR (1996) Roles of the DNA mismatch repair genes in colorectal tumorigenesis. *Int J Cancer* 69:47-49.

Boni L, Cassinotti E, Canziani M, Dionigi G, Rovera F, Dionigi R (2007) Free circulating DNA as possible tumour marker in colorectal cancer. *Surg Oncol* 16 Suppl 1:S29-31.

Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughton K, Cruciat C, Eberhard D, Gagneur J, Ghidelli S, Hopf C, Huhse B, Mangano R, Michon AM, Schirle M, Schlegl J, Schwab M, Stein MA, Bauer A, Casari G, Drewes G, Gavin AC, Jackson DB, Joberty G, Neubauer G, Rick J, Kuster B, Superti-Furga G (2004) A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* 6:97-105.

Carson DJ, Santoro IM, Groden J (2004) Isoforms of the APC tumor suppressor and their ability to inhibit cell growth and tumorigenicity. *Oncogene* 23:7144-7148.

Caspari R, Friedl W, Mandl M, Moslein G, Kadmon M, Knapp M, Jacobasch KH, Ecker KW, Kreissler-Haag D, Timmermanns G, et al. (1994) Familial adenomatous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer. *Lancet* 343:629-632.

Chen CY, Shiesh SC, Wu SJ (2004) Rapid detection of K-ras mutations in bile by peptide nucleic acid-mediated PCR clamping and melting curve analysis: comparison with restriction fragment length polymorphism analysis. *Clin Chem* 50:481-489.

Chen Z, Fadiel A, Naftolin F, Eichenbaum KD, Xia Y (2005) Circulation DNA: biological implications for cancer metastasis and immunology. *Med Hypotheses* 65:956-961.

Chim SS, Jin S, Lee TY, Lun FM, Lee WS, Chan LY, Jin Y, Yang N, Tong YK, Leung TY, Lau TK, Ding C, Chiu RW, Lo YM (2008) Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21: toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21. *Clin Chem* 54:500-511.

Chiu RW, Poon LL, Lau TK, Leung TN, Wong EM, Lo YM (2001) Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin Chem* 47:1607-1613.

Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19:43-51.

Dabritz J, Hanfler J, Preston R, Stieler J, Oettle H (2005) Detection of Ki-ras mutations in tissue and plasma samples of patients with pancreatic cancer using PNA-mediated PCR clamping and hybridisation probes. *Br J Cancer* 92:405-412.

Delattre O, Olschwang S, Law DJ, Melot T, Remvikos Y, Salmon RJ, Sastre X, Validire P, Feinberg AP, Thomas G (1989) Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. *Lancet* 2:353-356.

Dunlop MG (1996) Mutator genes and mosaicism in colorectal cancer. *Curr Opin Genet Dev* 6:76-81.

Ehnfors J, Kost-Alimova M, Persson NL, Bergsmedh A, Castro J, Levchenko-Tegnebratt T, Yang L, Panaretakis T, Holmgren L (2009) Horizontal transfer of tumor DNA to endothelial cells in vivo. *Cell Death Differ* 16:749-757.

Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767.

Fernandez-Vega C, Garcia-Olmo DC, Ballesteros MA, Garcia-Olmo D (2002) Development of a simple and sensitive technique for detection of point mutations in the K-ras oncogene. *Mol Biotechnol* 22:115-121.

Flamini E, Mercatali L, Nanni O, Calistri D, Nunziatini R, Zoli W, Rosetti P, Gardini N, Lattuneddu A, Verdecchia GM, Amadori D (2006) Free DNA and carcinoembryonic antigen serum levels: an important combination for diagnosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 12:6985-6988.

Fleischhacker M, Schmidt B (2007) Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta* 1775:181-232.

Fleischhacker M, Schmidt B (2008) Cell-free DNA resuscitated for tumor testing. *Nat Med* 14:914-915.

Fodde R, Smits R, Clevers H (2001) APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 1:55-67.

Fournie GJ, Courtin JP, Laval F, Chale JJ, Pourrat JP, Pujazon MC, Lauque D, Carles P (1995) Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer Lett* 91:221-227.

Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC (1994) A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 331:1669-1674.

Fukuyama R, Nicolaita R, Ng KP, Obusez E, Sanchez J, Kalady M, Aung PP, Casey G, Sizemore N (2008) Mutated in colorectal cancer, a putative tumor suppressor for serrated colorectal cancer, selectively represses beta-catenin-dependent transcription. *Oncogene* 27:6044-6055.

García S, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Garcia-Castro J, Bernad A (2010) Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 316: 1648-1650.

García-Olmo D, García-Olmo DC, Ontanon J, Martinez E (2000) Horizontal transfer of DNA and the "genometastasis hypothesis". *Blood* 95:724-725.

García-Olmo D, García-Olmo DC, Ontanon J, Martinez E, Vallejo M (1999) Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genometastasis. *Histol Histopathol* 14:1159-1164.

García-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, De-La-Quintana P, García-Arranz M, Pascual M (2009) Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 52:79-86.

García-Olmo DC, Domínguez C, Garcia-Arranz M, Anker P, Stroun M, Garcia-Verdugo JM, García-Olmo D (2010) Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res* 70:560-567.

García-Olmo DC, García-Rivas M, Garcia-Olmo D, Ontanon J (2003) The site of injection of tumor cells in rats does not influence the subsequent distribution of metastases. *Oncol Rep* 10:903-907.

García-Olmo DC, Gutierrez-Gonzalez L, Ruiz-Piqueras R, Picazo MG, García-Olmo D (2005) Detection of circulating tumor cells and of tumor DNA in plasma during tumor progression in rats. *Cancer Lett* 217:115-123.

García-Olmo DC, Ruiz-Piqueras R, García-Olmo D (2004) Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) and its relation to stem cells and cancer metastasis: state of the issue. *Histol Histopathol* 19:575-583.

García-Olmo DC, Samos J, Picazo MG, Asensio AI, Toboso I, Garcia-Olmo D (2008) Release of cell-free DNA into the bloodstream leads to high levels of non-tumor plasma DNA during tumor progression in rats. *Cancer Lett* 272:133-140.

Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chasse E, Ratschiller D, Weder W, Joerger M, Betticher DC, Stahel RA, Ziegler A (2004) Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol* 22:4157-4164.

Gerdes H (1991) Colon cancer and the p53 oncogene. *Gastroenterology* 100:842-843.

Gervaz P, Bouzourene H, Cerottini JP, Chaubert P, Benhattar J, Secic M, Wexner S, Givel JC, Belin B (2001) Dukes B colorectal cancer: distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location. *Dis Colon Rectum* 44:364-372; discussion 372-363.

Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD (1998) Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas* 17:89-97.

Goldenberg DM, Pavia RA (1981) Malignant potential of murine stromal cells after transplantation of human tumors into nude mice. *Science* 212:65-67.

Goldenberg DM, Pavia RA (1982) In vivo horizontal oncogenesis by a human tumor in nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:2389-2392.

Gruber SB, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B (1999) Cancer, crash sites, and the new genetics of neoplasia. *Gastroenterology* 116:210-212.

Guadalajara H, Dominguez-Berzosa C, Garcia-Arranz M, Herreros MD, Pascual I, Sanz-Baro R, Garcia-Olmo DC, Garcia-Olmo D (2008) The concentration of deoxyribonucleic acid in plasma from 73 patients with colorectal cancer and apparent clinical correlations. *Cancer Detect Prev* 32:39-44.

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.

Hartsough MT, Steeg PS (2000) Nm23/nucleoside diphosphate kinase in human cancers. *J Bioenerg Biomembr* 32:301-308.

Holdenrieder S, Stieber P, Chan LY, Geiger S, Kremer A, Nagel D, Lo YM (2005) Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR. *Clin Chem* 51:1544-1546.

Holmgren L, Szeles A, Rajnavolgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, Falk KI (1999) Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 93:3956-3963.

Hunter KW, Crawford NP, Alsarraj J (2008) Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res* 10 Suppl 1:S2.

Iero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, Fais S, Rivoltini L (2008) Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ* 15:80-88.

Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 61:1659-1665.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008) Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 58:71-96.

Johnson PJ, Lo YM (2002) Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. *Clin Chem* 48:1186-1193.

Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, Leichman L (1995) Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 55:1407-1412.

Jung M, Klotzek S, Lewandowski M, Fleischhacker M, Jung K (2003) Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clin Chem* 49:1028-1029.

Kapitanovic S, Radosevic S, Kapitanovic M, Andelinovic S, Ferencic Z, Tavassoli M, Primorac D, Sonicki Z, Spaventi S, Pavelic K, Spaventi R (1997) The expression of p185(HER-2/neu) correlates with the stage of disease and survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 112:1103-1113.

Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hamilton SR, Hedge P, Markham A, et al. (1991) Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 251:1366-1370.

Kohonen-Corish MR, Sigglekow ND, Susanto J, Chapuis PH, Bokey EL, Dent OF, Chan C, Lin BP, Seng TJ, Laird PW, Young J, Leggett BA, Jass JR, Sutherland RL (2007) Promoter methylation of the mutated in colorectal cancer gene is a frequent early event in colorectal cancer. *Oncogene* 26:4435-4441.

Kopreski MS, Benko FA, Kwee C, Leitzel KE, Eskander E, Lipton A, Gocke CD (1997) Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 76:1293-1299.

Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, et al. (1993) Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75:1215-1225.

Lecomte T, Berger A, Zinzindohoue F, Micard S, Landi B, Blons H, Beaune P, Cugnenc PH, Laurent-Puig P (2002) Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int J Cancer* 100:542-548.

Lefebure B, Charbonnier F, Di Fiore F, Tuech JJ, Le Pessot F, Michot F, Michel P, Frebourg T (2010) Prognostic value of circulating mutant DNA in unresectable metastatic colorectal cancer. *Ann Surg* 251:275-280.

Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 37:646-650.

Li CN, Hsu HL, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, Wu JT (2003) Cell-free DNA is released from tumor cells upon cell death: a study of tissue cultures of tumor cell lines. *J Clin Lab Anal* 17:103-107.

Li FY, Lai MD (2009) Colorectal cancer, one entity or three. *J Zhejiang Univ Sci B* 10:219-229.

Li JZ, Steinman CR (1989) Plasma DNA in systemic lupus erythematosus. Characterization of cloned base sequences. *Arthritis Rheum* 32:726-733.

Lichtenstein AV, Melkonyan HS, Tomei LD, Umansky SR (2001) Circulating nucleic acids and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 945:239-249.

Lo YM (2000) Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications. *Clin Chem* 46:1903-1906.

Lo YM, Rainer TH, Chan LY, Hjelm NM, Cocks RA (2000) Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem* 46:319-323.

Luo JD, Chan EC, Shih CL, Chen TL, Liang Y, Hwang TL, Chiou CC (2006) Detection of rare mutant K-ras DNA in a single-tube reaction using peptide nucleic acid as both PCR clamp and sensor probe. *Nucleic Acids Res* 34:e12.

Mandel P, Métais P (1948) Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci* 112: 241-243.

Miyaki M, Nishio J, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Nagato M, Chong JM, Koike M, Terada T, Kawahara Y, Fukutome A, Tomiyama J, Chuganji Y, Momoi M, Utsunomiya J (1997) Drastic genetic instability of tumors and normal tissues in Turcot syndrome. *Oncogene* 15:2877-2881.

Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Ichikawa A, Maekawa M, Shitoh K, Igarashi S, Kotake K, Koyama Y, Nagai H (2001) Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology* 121:1300-1309.

Nguyen DX, Bos PD, Massague J (2009) Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 9:274-284.

Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA (2009) MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer* 9:293-302.

Paget S (1989) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 8:98-101.

Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al. (1994) Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 263:1625-1629.

Park DI, Kang MS, Oh SJ, Kim HJ, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Han WK, Kim H, Ryu SH, Sepulveda AR (2007) HER-2/neu overexpression is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 22:491-497.

Pelengaris S, Khan M (2003) The many faces of c-MYC. *Arch Biochem Biophys* 416:129-136.

Pulciani S, Santos E, Lauver AV, Long LK, Aaronson SA, Barbacid M (1982) Oncogenes in solid human tumours. *Nature* 300:539-542.

Pulciani S, Santos E, Lauver AV, Long LK, Barbacid M (1982) Transforming genes in human tumors. *J Cell Biochem* 20:51-61.

Pulciani S, Santos E, Lauver AV, Long LK, Robbins KC, Barbacid M (1982) Oncogenes in human tumor cell lines: molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:2845-2849.

- Rainer TH, Wong LK, Lam W, Yuen E, Lam NY, Metreweli C, Lo YM (2003) Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem* 49:562-569.
- Ramsay RG, Gonda TJ (2008) MYB function in normal and cancer cells. *Nat Rev Cancer* 8:523-534.
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A (2005) Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65:3035-3039.
- Sadahiro S, Suzuki T, Ishikawa K, Nakamura T, Tanaka Y, Ishizu K, Yasuda S, Makuuchi H, Murayama C (2005) Estimation of the time of pulmonary metastasis in colorectal cancer patients with isolated synchronous liver metastasis. *Jpn J Clin Oncol* 35:18-22.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Schuell B, Gruenberger T, Scheithauer W, Zielinski C, Wrba F (2006) HER 2/neu protein expression in colorectal cancer. *BMC Cancer* 6:123.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88:593-602.
- Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA (1983) Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 51:2116-2120.
- Shibata D, Schaeffer J, Li ZH, Capella G, Perucho M (1993) Genetic heterogeneity of the c-K-ras locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 85:1058-1063.
- Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA (1981) Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290:261-264.
- Shiraki K, Tsuji N, Shioda T, Isselbacher KJ, Takahashi H (1997) Expression of Fas ligand in liver metastases of human colonic adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6420-6425.

Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, Vogelstein B (1992) Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 256:102-105.

Sorenson GD (2000) Detection of mutated KRAS2 sequences as tumor markers in plasma/serum of patients with gastrointestinal cancer. *Clin Cancer Res* 6:2129-2137.

Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL (1994) Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3:67-71.

Sozzi G, Roz L, Conte D, Mariani L, Andriani F, Verderio P, Pastorino U (2005) Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays. *J Natl Cancer Inst* 97:1848-1850.

Spirio L, Olschwang S, Groden J, Robertson M, Samowitz W, Joslyn G, Gelbert L, Thliveris A, Carlson M, Otterud B, et al. (1993) Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 75:951-957.

Steinman CR (1979) Circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Association with central nervous system involvement and systemic vasculitis. *Am J Med* 67:429-435.

Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L (1998) Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393:229-234.

Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA (1987) Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23:707-712.

Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M (1989) Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 46:318-322.

Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Mulcahy HE, Anker P (2001) Alu repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA: evidence for a preferential release from viable cells? *Ann N Y Acad Sci* 945:258-264.

Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P (2001) About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 313:139-142.

Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, Rossier A, Chen XQ, Anker P (2000) The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci* 906:161-168.

Swaminathan R, Butt AN (2006) Circulating nucleic acids in plasma and serum: recent developments. *Ann N Y Acad Sci* 1075:1-9.

Swinkels DW, Wiegerinck E, Steegers EA, de Kok JB (2003) Effects of blood-processing protocols on cell-free DNA quantification in plasma. *Clin Chem* 49:525-526.

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260:816-819.

Thijssen MA, Swinkels DW, Ruers TJ, de Kok JB (2002) Difference between free circulating plasma and serum DNA in patients with colorectal liver metastases. *Anticancer Res* 22:421-425.

Tong YK, Lo YM (2006) Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clin Chim Acta* 363:187-196.

Tsui DW, Chan KC, Chim SS, Chan LW, Leung TY, Lau TK, Lo YM, Chiu RW (2007) Quantitative aberrations of hypermethylated RASSF1A gene sequences in maternal plasma in pre-eclampsia. *Prenat Diagn* 27:1212-1218.

Urnovitz HB, Tuite JJ, Higashida JM, Murphy WH (1999) RNAs in the sera of Persian Gulf War veterans have segments homologous to chromosome 22q11.2. *Clin Diagn Lab Immunol* 6:330-335.

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9:654-659.

Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R (1989) Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244:207-211.

Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, Hood LE, Galas DJ (2009) Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4402-4407.

Wang YH, Ho ML, Chang JK, Chu HC, Lai SC, Wang GJ (2009) Microporation is a valuable transfection method for gene expression in human adipose tissue-derived stem cells. *Mol Ther* 17:302-308.

Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ (2005) Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 5:591-602.

Wright PK (2008) Targeting vesicle trafficking: an important approach to cancer chemotherapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 3:137-147.

Yuan A, Farber EL, Rapoport AL, Tejada D, Deniskin R, Akhmedov NB, Farber DB (2009) Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One* 4:e4722.

Zaenen I, Van Larebeke N, Van Montagu M, Schell J (1974) Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J Mol Biol* 86:109-127.

Zhong XY, Ladewig A, Schmid S, Wight E, Hahn S, Holzgreve W (2007) Elevated level of cell-free plasma DNA is associated with breast cancer. *Arch Gynecol Obstet* 276:327-331.

ANEXO